

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD

FOLIA  
BIOLOGICA

TOMUS III

1957

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

*Международное издание журналов Československá biologie и Československá mikrobiologie*

Редакционная коллегия:

Академик И. Малек (главный редактор), В. Вршанский, М. Гаšek, чл.-корр. ЧСАН Ф. Герчик, академик О. Ировец, Ю. Мацура, академик С. Прат, Б. Росицкий (секр. ред. коллегии), Л. Черный, Я. Штерцль.

Переводы на русский язык: доц. д-р Широ́ва, на английский язык: д-р Ридесова, на немецкий язык: д-р Файгль

Издается Биологическим институтом Чехословацкой Академии наук в Издательстве ЧСАН. Выходит 6 раз в год. Подписная цена на 1 год Kčs 60.—, цена одного номера Kčs 10.—. Адрес редакции: Биологический институт ЧСАН, На цвижишти 2, Прага XIX. Заказы: Артия, Смедчки 30, Прага II, Чехословакия.

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

*International Edition of the Journals Československá biologie and Československá mikrobiologie*

Editorial Board:

Academician I. Málek (Chief Editor), L. Černý, M. Hašek, Corresponding Member of the Czechoslovak Academy of Science F. Herčík, Academician O. Jírovec, J. Macura, Academician S. Prát, B. Rosický (Editorial Secretary), J. Šterzl, V. Vršanský.

Translations into Russian: Dr Schierová, into English: Dr Ridesová, into German: Dr Feigel.

Issued by Biologický ústav Československé akademie věd at Nakladatelství Čs. akademie věd. Yearly subscription (6 numbers) Kčs 60. Single number Kčs 10. Address: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha XIX. Orders: Artia, Smečky 30, Praha II, Czechoslovakia.

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

*Internationale Ausgabe der Zeitschriften Československá biologie und Československá mikrobiologie*

Redaktionsrat:

Akademiemitglied I. Málek (leitender Redakteur), L. Černý, M. Hašek, korresp. Mitgl. d. Čs. Akademie d. Wiss. F. Herčík, Akademiemitglied O. Jírovec, J. Macura, Akademiemitglied S. Prát, B. Rosický (Redaktions-Sekretär), J. Šterzl, V. Vršanský.

Die Übersetzungen besorgt Doz. Dr A. Schierová für die russischen, Dr A. Ridesová für die englischen und Dr T. Feigel für die deutschen Artikel.

Herausgeber: Biologický ústav Československé akademie věd durch Vermittlung des Nakladatelství Čs. akademie věd. 6 Lieferungen jährlich. Abonnementpreis 60 Kčs, Preis der Einzelnummer 10 Kčs. Anschrift der Redaktion: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha XIX. Zu beziehen durch: Artia, Smečky 30, Praha II, Československo.

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. (1957) — Fasc. 2.

### The Transfer of Antibody Formation by Means of a Polymorphonuclear Exudate

J. ŠTERZL

Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Department of Microbiology, Praha

Received December 21, 1956

In earlier experiments in hyperimmunised animals it was demonstrated that by freezing and thawing proteins could be extracted from the repeatedly washed cells of a polymorphonuclear exudate, which became bound with the specific antigen. On making an electrophoretic study of the rate of movement at different pH, it was seen that the character of these proteins was not identical with the serum antibodies. Following immunisation with a single dose of the antigen, antibodies were demonstrated in polymorphonuclear cells for only a short period after immunisation (Šterzl 1952, 1954).

In the latest work the presence of developing antibodies in tissues is determined by means of their transfer to non-immunised recipients which do not themselves react to an antigen by antibody formation (animals irradiated by X-ray, five-day-old rabbits — Šterzl 1955). In the present work the same method is used for carrying out a revision of earlier results on the basis of which it was assumed that antibodies are also formed in the cells of a polymorphonuclear exudate.

#### Materials and Method

The polymorphonuclear exudate was prepared by filling normal and immunised rabbits with 300—400 ml. physiological saline administered intraperitoneally. After 4—5 hours the exudate is drawn off and sedimentation of the cells is carried out by centrifuging at 500 g. The cellular sediment is washed three times in gelatinous physiological saline. During washing the number of cells is adjusted to approximately 20—30,000/ $\mu$ l., according to the degree of turbidity, and is then determined exactly by counting in a Bürker chamber. In the case of every exudate a smear is taken and a differential count made from 100 cells. Polymorphonuclear cells and typical lymphocytes are determined precisely; the other cells of the peritoneal exudate are grouped together as macrophages, in view of the difficulty of precise differentiation. After four hours' peritoneal filling in rabbits, the cells in the exudate other than polymorphonuclear cells average only 5—20 %. Adult rabbits weighing 2—3 kg. were used as donors; these were immunised by the intravenous route with *Salmonella paratyphi B* inactivated by heating for one hour at 70 °C. The number of doses and the intervals between the doses are given in the text to figures. In experiments in which cells were isolated from non-immunised animals and mixed with the antigen in vitro, the same antigen (*S. paratyphi B*) was used. The amount of spleen cells used in the experiment and the amount of antigen added to the cells in vitro are the same as in a previous communication (Šterzl 1957). These data are given in greater detail in the text relating to the individual figures.

The serum used for adsorption on to the cells of the peritoneal exudate and for experiments with the passive transfer of antibodies to young rabbits was rabbit serum obtained by immunisation with the same strain of *S. paratyphi B* as that used as the antigen. The titre of the serum was 1 : 400, i. e. it was not lower than the titre of antibodies in the serum of any of the donors from whose peritoneal exudate cells were obtained.

Washed cells, concentrated to the given number, were transferred by the intraperitoneal route to ve-day-old rabbits from which blood was collected by cardiac puncture. The collection intervals are

shown in the various figures concerned. The exact method for determining antibodies in young rabbits has already been described (Šterzl 1955). The agglutinations were placed in a refrigerator and the results read off after four and six days.

### Results

#### Transfer of Cells of Polymorphonuclear Exudate Obtained at Various Intervals from Rabbits Immunised with One Dose of Antigen

Altogether 11 experiments were carried out in this series, transfer being made to 57 young rabbits from 11 litters. Rabbits were immunised with 1 ml. bacterial antigen by the intravenous route and peritoneal exudate produced at various intervals following immunisation. A different donor was used for every experiment.

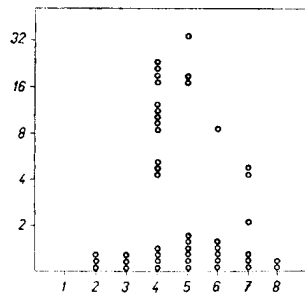


Fig. 1. Formation of antibodies following transfer to young rabbits by means of cells of peritoneal exudate from donor (rabbit) immunised with single dose of antigen ( $10^8$  micro-organisms).  $x$ : days after immunisation when peritoneal exudate was produced and cells obtained. Every recipient is denoted by one point.  $y$ : antibody values. The highest antibody titres reached during the ten days following transfer are always given. Recordings were made only from animals which survived and in which all collections of blood were made.

The exudates were prepared in the rabbits 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 days after commencing immunisation. A survey of the results is given in fig. 1. It is seen that a positive demonstration of antibodies was obtained by the transfer of cells of peritoneal exudate isolated from rabbits four and five days after immunisation. The course of antibody formation following the transfer of cells from a rabbit four days after immunisation is shown in fig. 2. On comparing these results with results obtained from the transfer of spleen cells (Šterzl 1955, 1957) it is seen that in the present experiments with the transfer of cells of polymorphonuclear exudate antibody formation is less regular and very restricted as regards time.

#### Transfer of Cells of Polymorphonuclear Exudate Obtained from Repeatedly Immunised and Revaccinated Animals

In four experiments, rabbits which had been repeatedly immunised a number of times were used as donors. Transfer was made to 32 young rabbits. Fig. 3 gives an example of a transfer of cells from a revaccinated animal; fig. 4 shows the result of a transfer of cells from a repeatedly and intensively immunised donor. The doses are given in the appended text. As compared with immunisation with a single dose, a marked increase in the intensity of antibody formation in the recipients was observed, which was also of longer duration and more standard in character. The intensive and uniform formation of antibodies following the transfer of cells from a repeatedly and intensively immunised donor is particularly striking. As compared with the cell counts in the peritoneal exudate of animals immunised once and several times, it is seen that the intensive antibody formation observed in these last experiments cannot be explained by different percentual proportion of the various types of cells in the peritoneal exudate.

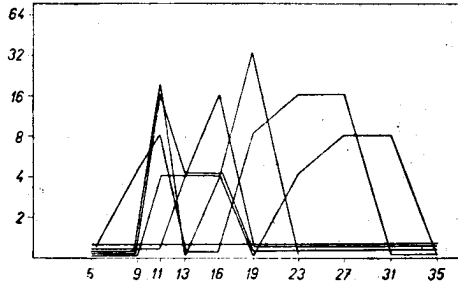


Fig. 2.

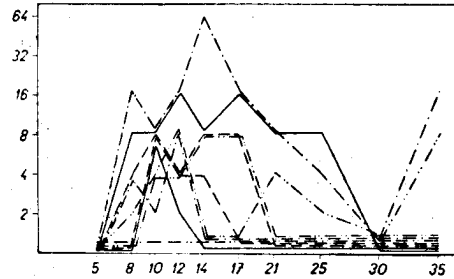


Fig. 3.

Fig. 2. Normal rabbit immunised with 1 ml. ( $10^6$  micro-organisms) four days before formation of peritoneal exudate from 400 ml. physiological saline. Exudate drawn off after five hours by puncture and centrifuged. Exudate fluid, freed from cells, lyophilized (120 ml.) and dissolved in 6 ml. Agglutination titre of concentrated exudate fluid 1 : 16, rabbit serum 1 : 64. Cells washed and injected intraperitoneally in young rabbits in amounts of 1 ml. ( $228 \times 10^6$  cells). Extraction of cells carried out by freezing and thawing; agglutination reaction of extract negative. Cell count: polymorphonuclears 82, lymphocytes 17, macrophages 1.  $x$ : age of rabbits in days,  $y$ : titre of antibodies.

Fig. 3. Rabbits Nos. 801, 802, 803, 804, born 7. 12. 1954 and injected on fifth day of life with nucleoprotein fractions. Revaccinated on 12. 4. 1955 with 1 ml *Salmonella paratyphi B*, intravenously ( $10^7$  micro-organisms), on 9. 5. 1955 with 1 ml. ( $2 \times 10^8$  micro-organisms). On 10. 5. 1955 filling of rabbits with physiological saline carried out; after washing, cells injected in amounts of 2 ml. ( $40 \times 10^6$  micro-organisms) in young rabbits. Cell count in exudates:

Rabbit No. 801: polymorphonuclears 98, lymphocytes 6, macrophages 6,

No. 802: polymorphonuclears 91, lymphocytes 9, macrophages 0,

No. 803: polymorphonuclears 90, lymphocytes 8, macrophages 2,

No. 804: polymorphonuclears 82, lymphocytes 8, macrophages 10.

Young rabbits Nos. 201 and 202 injected with 1 ml. leucocytes from donor No. 801 — full lines.

Young rabbits Nos. 203 and 204 injected with leucocytes from donor No. 803 — dashed line.

Young rabbits Nos. 205 and 206 injected with leucocytes from donor No. 804 — dotted line.

Young rabbits Nos. 207 and 208 injected with leucocytes from donor No. 802 — dash and two dots.

Control without injection — two dashes and two dots.  $x$ : age of rabbits in days;  $y$ : titre of antibodies.

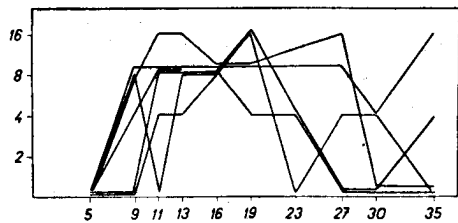


Fig. 4.

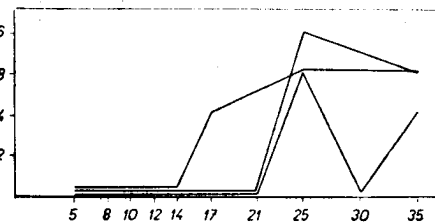


Fig. 5.

Fig. 4. Rabbit No. 42, immunised from 30. 9. 1955 to 30. 1. 1956 three times weekly, first with seven doses of a suspension of  $10^8$  micro-organisms/ml., then with 20 doses of  $2 \times 10^8$  micro-organisms/ml. Three days after last injection peritoneal exudate produced by a filling of 400 ml. physiological saline. After five hours the exudate was drawn off and the cells centrifuged. The supernatant fluid (80 ml.) was dried by lyophilization and dissolved in 5 ml. distilled water and dialyzed against physiological saline. Agglutination in the concentrated fluid was negative, 1 ml. of a washed suspension of cells ( $24 \times 10^6$  cells) injected intraperitoneally in five-day-old rabbits. Differential count: polymorphonuclears 82, lymphocytes 6, macrophages 12.  $x$ : age of young rabbit and time of blood collection in days.  $y$ : titre of antibodies in blood of young rabbits.

Fig. 5. Normal rabbit filled with 500 ml. physiological saline. Resultant exudate washed five times in physiological saline.  $228 \times 10^6$  cells/ml. After washing the cells were mixed with the antigen (1 cell of exudate to 2 micro-organisms of *S. paratyphi B*). The mixture was injected intraperitoneally in young rabbits.  $x$ : age of young rabbit and time of blood collection in days.  $y$ : titre of antibodies in blood of young rabbits.

### Transfer of Cells of Polymorphonuclear Exudate of Non-immunised Animals after Mixing with Antigen in vitro

Six experiments were carried out in this series, with transfer to 40 young animals. These experiments were based on the experience that if cells which are capable of changing their metabolism (e. g. spleen cells) are mixed with the antigen in vitro, they are able to form antibodies on being transferred intraperitoneally to young animals (Šterzl 1957). The cells of peritoneal exudate from normal animals were therefore isolated, mixed with the antigen and transferred to young rabbits by the intraperitoneal route. In none of these experiments was antibody formation observed in the first period following the transfer. The recording from one group (fig. 5) shows that antibodies cannot be demonstrated until the young animals are themselves able to react actively to an antigen by the formation of antibodies.

### Transfer of Leucocytes from Non-immunised Animals, Incubated in vitro with Immune Serum

An attempt was made in earlier experiments (Šterzl 1952) to ascertain whether the transfer of antibody formation by means of cells of polymorphonuclear exudate is true antibody formation, or whether serum antibodies are only adsorbed on to the cells. In the present experiments, in which the transfer of cells was used to demonstrate antibody formation, the control experiments were carried out by the same method.

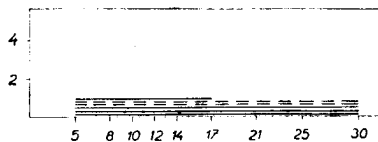


Fig. 6. Normal rabbit filled with 450 ml. physiological saline; exudate drawn off after five hours. Differential count: polymorphonuclears 86, lymphocytes 10, macrophages 4. After washing,  $183 \times 10^6$  cells/ml. Cells transferred to two young rabbits — dashed lines. Remainder centrifuged and suspended in the same volume of immune serum against *S. paratyphi B* (titre 1:400). Incubated with serum for 30 minutes at 37° C and 30 r. p. m. After incubation serum removed and titre of antibodies again determined (no change.) Cell sediment washed three times and suspended in original amount of fluid. Number of cells  $176 \times 10^6/1$  ml., 1 ml. cells injected intraperitoneally in young rabbits. Extract made from 2 ml. suspension of leucocytes by freezing and thawing; agglutination reaction of extract negative.

A known amount of serum antibodies was adsorbed on to the cells of a peritoneal exudate, the cells were washed three times in gelatinous physiological saline and transferred by the intraperitoneal route to young rabbits. In all, three such experiments were carried out on 25 young rabbits. In no case antibody was found, either in the young animals or in extracts of leucocytes. A detailed description of one of these experiments is given in fig. 6. In the same way, no decrease in the titre of antibodies (i. e. adsorption by the cells) was found following incubation of cells together with serum of a known titre. Negative demonstration of antibodies following transfer is easily understandable when antibodies were not found even by direct agglutination in an extract of cells. Passive transfer of serum of the given titre (1:400) was demonstrated in the serum of young rabbits if the injection was made with 1 ml. of concentrated serum and serum diluted in the proportion of 1:10. On injecting serum diluted in the proportion of 1:100, antibodies were not demonstrated serologically in the blood of young rabbits. It may therefore be assumed that if a slight amount of antibodies remains adsorbed on to the polymorphonuclear leucocytes, it will not be possible to demon-

strate these antibodies serologically in the blood of young rabbits following transfer.

There is also a possibility, however, that a serologically demonstrable amount of antibodies, adsorbed on to the cells, may become bound, during preparation of the extract by freezing and thawing, to some components of the cells and lose their

serological effectiveness. In such a case, although they might be present, it would not be possible to demonstrate the antibodies. This eventuality was verified by mixing a centrifuged suspension of cells ( $30 \times 10^6/\text{ml.}$ ) obtained from rabbit exudate with the same amount of serum of the titre given above. Extraction of the cells was carried out by freezing and thawing immediately after mixing with the serum and after incubating at  $37^\circ\text{C}$  for 30 minutes. No change occurred in the titre of antibodies in the serum, either after simple incubation (they were not adsorbed on to the cells) or on mixing the cells with antibodies and disrupting them. This shows that cell components are not bound with serum antibodies in such a way as to mask their serological activity.

From these control experiments it is concluded that the antibody formation ascertained in preceding experiments following the transfer of cells of a polymorphonuclear exudate to young rabbits is the expression of biological activity of the cells and does not represent a passive transfer of already formed antibodies, but is the outcome of an active process of antibody formation by the cells.

#### *Discussion*

The literature on the question of antibody formation and its association with different types of cells has already been reviewed in an earlier communication (Šterzl 1954, pp. 45—51). It was shown that a number of authors associate antibody formation only with certain particular types of cells. More recently, especially among Scandinavian authors (Bjorneboe, Gormsen and Lundquist 1947, Fagraeus 1948) and in the work of Ehrich et al. (1949) some authors have come to regard plasmatic cells as the main site of antibody formation (e. g. Coons et al. 1955, Forshter 1955). Other experimental results, however, provide evidence that further types of cells participate in the formation of antibodies (Girard and Murray 1954, Roberts and Dixon 1955, Sinkovics 1955, Stoner and Hale 1955).

Not only in theory, but also in the experimental work, very little attention is paid to the participation of phagocytic cells in antibody formation. Any such study is based on the assumption expressed by Ehrich, Harris and Mertens (1946) that the participation of phagocytosing cells consists merely in engulfing and digesting the antigen so as to prepare the way for the actually active cells, the lymphocytes and plasmocytes. Since it has been demonstrated, however (Walsh and Smith 1951, Roberts 1955) that antigen digested by phagocytes decreases the antibody reaction, it is concluded that this does not participate in antibody formation. Further proof is to be found in experiments (Ehrich et al. 1946, Roberts 1955) demonstrating that phagocytic cells which invade inflammation of the skin or peritoneum and are then injected with antigen, do not form antibodies. It may be assumed that mature phagocytic cells which invade artificially produced inflammation are not capable of antibody formation. This is also demonstrated in our experiments in which the cells of an exudate were isolated, mixed with antigen and administered to young rabbits. No formation of antibodies was demonstrated in any of these experiments. On the other hand, antibody transfer was demonstrated using the same types of exudate cells, when the cells were collected four and five days after immunisation. The author takes the view that these experiments confirm the assumption that the cells of mesenchymal tissue can change their metabolism if they come into contact with antigen, not in a mature state, but in the course of their development.

It is especially necessary to estimate whether the transfer of antibody formation to young rabbits is mediated by the polymorphonuclear cells or whether other types of cells contained in small amounts in the exudate are responsible. When making the transfer, amounts of  $20-30 \times 10^6$  cells are used; this is the smallest amount found

to be satisfactory in making a transfer of very effective spleen cells. It is an amount many times less than that used by Harris (1954), the smallest quantity used by whom is  $150 \times 10^6$ . Since the transfer of antibody formation is also directly dependent on the quantity of transferred cells, it is hardly likely that so small a percentage of lymphocytes and macrophages would participate in the antibody reaction. In order to form a definite conclusion, however, it would be necessary to follow up the morphological fate of the various types of cells transferred and to ascertain whether the proportion determined by the count in the smear does not change in the recipient through proliferation of one type of cell.

The above results again support the assumption that antibody formation is a metabolic change in various cells and tissues. Particular significance is attached to the metabolic change in the course of immunisation in cells such as polymorphonuclear cells, which participate directly and to a large extent in the defence processes of the organism.

#### Summary

An investigation was made of the possibility of transferring antibody formation from adult immunised rabbits by means of cells of a polymorphonuclear exudate to five-day-old rabbits. Following a single immunisation dose of antigen ( $10^8$  microorganisms of *Salmonella paratyphi B*), antibody formation was transferred to young rabbits by means of the cells of a polymorphonuclear exudate only when the cells had been obtained from the exudate four days after immunisation at the earliest. Antibody formation in young animals, when produced by the cells of a donor, immunised by a single dose, is of short duration and not standard in character. The cells of a polymorphonuclear exudate obtained from adult donors repeatedly immunised with several doses of antigen produce antibody formation in young animals which is more intense, of longer duration and of a more standard nature than that produced by the transfer of cells from donors immunised with a single dose of antigen. The cells of a polymorphonuclear exudate obtained from normal, non-immunised rabbits and mixed with the antigen in vitro, never form antibodies on being transferred intraperitoneally to young rabbits. Adsorption of antibodies on to polymorphonuclear leucocytes was not demonstrated, either by direct serological tests or by transfer of the cells to young rabbits. It is concluded that the cells of polymorphonuclear exudate also participate in immunity processes in the organism, but only those cells that have come into contact with the antigen in the course of their development, and not the mature cells of polymorphonuclear exudate.

#### References

- Bjorneboe, M., Gormsen, H., Lundquist, F.: Further Experimental Studies on the Role of Plasma Cells as Antibody Producers. *J. Immunol.* 55 : 121, 1947.  
Coons, A. H., Ledus, E. H., Connolly, J. M.: Studies on Antibody Production. I. Method for the Histochemical Demonstration of Specific Antibody and its Application to a Study of the Hyperimmune Rabbit. *J. Exp. Med.* 102 : 49, 1955.  
Ehrich, W. E., Harris, T. N., Mertens, E.: The Absence of Antibody in the Macrophages during Maximum Antibody Formation. *J. Exp. Med.* 83 : 373, 1946.  
Ehrich, W. E., Drabkin, D. L., Forman, C.: Nucleic Acid and Production of Antibodies by Plasma Cells. *J. Exp. Med.* 90 : 157, 1949.  
Ehrich, W. E.: Cellular Sources of Antibodies. *Blood Cells and Plasma Proteins*. New York 1953 (p. 187).  
Fagraeus, A.: Antibody Production in Relation to the Development of Plasma Cells. *Acta med. scand. Suppl.* 204, 1948.  
Girard, K. F., Murray, E. G. D.: The Presence of Antibody in Macrophage Extracts. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 32 : 14, 1954.

- Harris, S., Harris, T. N., Farber, M. B.: Studies on the Transfer of Lymph Node Cells. I. Appearance of Antibody in Recipients of Cells from Donor Rabbits Injected with Antigen. *J. Immunol.* 72 : 148, 1954.
- Roberts, K. B.: The Failure of Macrophages to Produce Antibodies. *Brit. J. Exp. Pathol.* 36 : 199, 1955.
- Roberts, J. C., Dixon, J. F.: The Transfer of Lymph Node Cells in the Study of the Immune Response to Foreign Proteins. *J. Exp. Med.* 102 : 379, 1955.
- Sinkovics, J.: Virus Neutralisation Experiments with Lymphoid Cell and Lymph Node Extracts. *Acta microbiol.* 2 : 385, 1955.
- Stoner, R. D., Hale, W. M.: Antibody Production by Thymus and Peyer's Patches in Intraocular Transplants. *J. Immunol.* 75 : 203, 1955.
- Šterzl, J.: Průkaz normálních a imunních globulinů v leukocytech zvířat immunisovaných bílkovinami. *Čs. biologie* 1 : 285, 1952.
- Šterzl, J.: Obranné pochody v organismu. Mesenchymální tkáň při infekci a imunisaci. Praha 1954.
- Šterzl, J.: The Demonstration and Biological Properties of the Tissue Precursor of Serum Antibodies. *Fol. biol. (Praha)* 1 : 193, 1955.
- Šterzl, J.: Tvorba protilátek izolovanými buňkami sleziny po smíšení s antigenem in vitro. *Čs. mikrobiol.* 2 : 1, 1957.
- Walsb, T. E., Smith, C.: The Influence of Polymorphonuclear Leucocytes and Macrophages on Antibody Production. *J. Immunol.* 66 : 303, 1951.
- Фортнер, Ф. К.: К вопросу о механизме образования антител лимфоидными клетками. *ЖМЕИ* (11) : 100, 1955.
- Штерцль, Я.: Доказательство наличия нормальных и иммунных  $\gamma$ -глобулинов в лейкоцитах. *Чсл. Биология* 1 : 299, 1952.

## Перенесение образования антител клетками полиморфонуклеарного экссудата

Я. ШТЕРЦЛЬ

### *Резюме*

В своей работе мы определяли, возможно ли с помощью клеток полиморфонуклеарного экссудата перенести способность к образованию антител от взрослых иммунизированных кроликов на 5-дневных крольчат. После однократной иммунизирующей дозы антигена ( $10^8$  микробов *S. paratyphi B*) удавалось передать крольчатам эту способность клетками полиморфонуклеарного экссудата только в случае, если эти клетки были получены из экссудата не раньше 4 дней после иммунизации. Способность к образованию антител, вызываемая у молодых животных клетками донора, иммунизированного однократной дозой, оказывается нестандартной и скоропреходящей. Клетки полиморфонуклеарного экссудата, полученного от взрослых доноров, повторно иммунизовавшихся несколькими дозами антигена, вызывают у молодых животных более интенсивное, более длительное и более стандартное образование антител, чем перенос клеток от доноров, иммунизированных одной дозой антигена. Клетки полиморфонуклеарного экссудата, полученные от нормальных, не иммунизированных кроликов и смешанные с антигеном in vitro, после переноса в полость брюшины крольчатам ни в одном случае не вызывали образования антител. Наличие адсорбции антител на полиморфонуклеарные лейкоциты не было нами доказано ни путем прямых серологических тестов, ни путем переноса клеток крольчатам. Из опытов мы делаем заключение, что и клетки полиморфонуклеарного экссудата принимают участие в перестройке организма в направлении иммунитета, но это бывают только те клетки, которые столкнулись с антигеном в процессе своего развития, а не уже сформировавшиеся клетки полиморфонуклеарного экссудата.

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. (1957) — Fasc. 2.

### Adoptive Transfer of Antibody Production in Poultry by Spleen Tissue

N. A. MITCHISON

Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Department of Experimental Biology and Genetics, Praha<sup>1)</sup>

Received October 26, 1956

Poultry are admirably adapted for immunological work. They are immunologically active, easily handled, and cheap; they have the further advantage that antigen may readily be introduced into the embryo in order to provoke immunological tolerance (Hašek 1954, Billingham, Brent and Medawar 1956). Yet the sites of antibody production in birds have not yet been definitely indentified, although the spleen (Makinodan, Ruth and Wolfe 1954), and bursa fabricius (Glick, Chang and Jaap 1956), have been implicated. The sites in birds are likely to be similar to those in mammals, but cannot be indentical, for structures homologous to the mammalian lymph nodes are not present in gallinaceous birds (Drinker and Yoffey 1941).

The design of the present experiments follows the adoptive transfers of immunity established in mammals (Billingham, Brent and Medawar 1954). The tissues selected for investigation were the spleen and bone marrow. These tissues were taken from actively immunized birds and transferred into secondary hosts. If cells producing antibody were included in the tissue, they were expected to continue antibody production in their new hosts. An appearance of antibody in the serum of the secondary hosts would therefore indicate that the transferred tissue is a site of antibody production.

#### Methods

Adult birds were immunized in three groups, to provide donors of potentially antibody-producing tissue, and their controls. Group 1 received intravenous injections of rabbit erythrocytes, washed three times and suspended in saline. The equivalent of 0.5 ml. packed cells were injected on days 1, 3, 5, 7, 9, 12 and 14, and the donors were killed and the tissue taken for transfer on day 22. Group 2 received similarly washed cells from a single cock selected at random, injected according to the same schedule. Group 3 received cells from the same cock as group 2; injections were given on days 1, 3, 5, 7, 9, 12, 14 and 24, and the tissue was transferred on day 27.

Antibody titrations were carried out by agglutination of the antigen used for immunization, according to the procedure of Hašek and Hraba (1955). In the agglutination of rabbit erythrocytes the end point was taken as the last tube showing macroscopic agglutination, even though agglutination might be detectable with the microscope in further dilutions of antibody.

Spleen tissue was prepared for transfer by weighing the organ, removing the capsule, and forcing the contents through a metal sieve into Ringer solution buffered to pH 7.2 with phosphate. The suspension was further broken up by forcing it rapidly in and out of a syringe, and so reducing it to small clumps and isolated cells. This material was injected, in a quantity of approximately 200 mg. tissue suspended in 1 ml., into the peritoneal cavity of the secondary hosts. Bone marrow was washed out of the femurs and tibias with buffered Ringer solution, and suspended by the same method as spleen tissue. This tissue could not be weighed with the same accuracy as spleen; approximately 100 mg. tissue was injected into the peritoneal cavity of each host.

Young chickens were used as hosts for the transferred tissue, 15–20 days old in groups 1 and 2, and 5–6 days old in group 3. The chickens tolerated the intraperitoneal injections well, and samples of

<sup>1)</sup> Present address of author: Zoology Department, University of Edinburgh, Scotland.

blood could readily be obtained by cardiac puncture. Young animals offer certain advantages as host for testing the immunological activity of transferred tissue: a large number of hosts can be given adequate quantities of tissue from a single donor; antigen transferred along with the tissue is less likely to provoke an immune response on its own account (Šterzl 1955); the transferred tissue may survive longer, as a consequence of delay in the homograft reaction of the host; and the natural agglutinins, which obscure results in adult hosts (Holland 1956), may be present in lower titre in the young.

The following controls were used. Actively immunized adult controls showed the activity of non-transferred antibody-producing tissue. Untreated chickens, of the same age as the hosts, showed the quantities of natural agglutinins present. Samples of tissue were frozen and thawed before transfer:

Serum antibody titres in donors and hosts, after transfer of tissue from immunized donors into secondary hosts

(1) Rabbit erythrocyte agglutination

	Days after transfer				
	0	2	5	9	14
Actively immunized control	1024		2048		2048
Actively immunized donor	2048				
Hosts receiving spleen tissue from immunized donor		8	16	16	4
		4	2	8	2
		4	128	8	1
		2	128	8	2
		4	128	16	4
Untreated host controls (natural agglutinin)				1, 2, 2, 2, 4, 4	1, 1, 2, 2, 4, 4

(2) Erythrocyte iso-agglutination

	Days after transfer				
	0	2	5	9	14
Actively immunized controls	64 32		64 8		32 8
Actively immunized donor	64				
Hosts receiving spleen tissue from immunized donor		1	1	0	0
		1	1	0	0
		2	2	0	0
		1	0	0	0
Hosts receiving frozen—thawed spleen tissue from immunized donor		0	0	0	0
		0	0	0	0
Hosts receiving spleen tissue from non-immunized donor			0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	

## (3) Erythrocyte iso-agglutination

	Days after transfer			
	0	2	4	11
Actively immunized donor	128			
Hosts receiving spleen tissue from immunized donor		2 2 2 4 2	4 2 2 4 2	1 0 0 0 0
Hosts receiving frozen—thawed spleen tissue from immunized donor		0, 0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0, 0
Hosts receiving bone marrow from immunized donor		0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0
Hosts receiving frozen—thawed bone marrow from immunized donor		0, 0	0, 0	0, 0

this procedure was expected to inhibit further production of antibody, so that this group showed the quantity of completed antibody transferred along with the tissue. Hosts which received spleen tissue from non-immunized donors showed whether injection of spleen cells alone could provoke detectable production of iso-agglutinins; furthermore, these hosts must have received a large dose of homologous erythrocytes, so that they also show whether antigen transferred from the iso-immunized donors could on its own account have provoked antibody production.

*Results and Discussion*

The antibody titres in the donors and hosts are shown in the table. In all groups, antibody is detectable in hosts which received spleen cells from immunized donors. The highest titres were found after immunization with rabbit erythrocytes, but with antigen natural agglutinins are already present even in the young hosts. Nevertheless, the levels are considerably lower in the control series. In the groups immunized with homologous erythrocytes, the titres in the secondary hosts are low, but the controls for the hosts are uniformly negative. Without immunization or adoptive transfer, in fact, not a trace of iso-agglutination could be found.

The principle conclusion to be drawn from these experiments is that antibody production can take place in the spleen of poultry. Except for the failure to transfer adoptive immunity with bone marrow, the present investigation gives no indication whether the spleen is the sole site of antibody production, or whether other tissues may also be concerned. The failure with bone marrow cannot be taken as conclusive, since smaller quantities were transferred on a weight basis, and the transplantation properties of the tissue may differ from the spleen. The activity of the spleen, after intravenous injection of antigen, is in accordance with findings in mammals (Coons, Leduc and Connolly 1955; for references to earlier work, see Roberts 1954). The site of production of antibody against antigen introduced locally into the tissues remains something of a problem in birds, which lack regional lymph nodes.

In each group, the antibody levels in the adoptive hosts are in approximately the same proportion to the levels in the actively immunized controls. The efficiency of the transfer cannot, therefore, have varied much between operations.

It has been argued that the temporary nature of adoptive immunity in mammals is a consequence of the homograft reaction of the host (Billingham, Brent and Medawar 1954). The median survival time of skin grafts between chickens, of the same age as the hosts in the present experiments, is less than 14 days (Cannon and Longmire 1952). Antibody production in the hosts, in the present experiments, declined between 5 and 9 days after transfer. This timing is thus in agreement with the hypothesis that transferred spleen tissue succumbs to the homograft reaction of the host, in a manner quantitatively similar to grafted skin.

### *Summary*

The subject of the present work is the ability of transplanted spleen and bone marrow tissue to produce antibodies in poultry. The tissues were taken from immunized adults and transferred by intraperitoneal injection into young chickens. Following transfer of spleen, but not bone marrow, antibodies could be detected in the host blood. Control experiments established that these antibodies were produced by the transferred cells in the hosts, and not transferred passively with the tissue, or produced by the host's own cells.

Rabbit and also homologous erythrocytes were used as antigens. With the rabbit antigen, higher antibody titres were obtained, but natural agglutinins were also present.

The efficiency of the transfer did not appear to vary much between operations.

The timing of antibody production in the hosts was in agreement with the hypothesis, that transferred spleen tissue succumbs to the homograft reaction of the host.

### *References*

- Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B.: Quantitative Studies on Tissue Transplantation Immunity. II. The Origin, Strength and Duration of Actively and Adoptively Acquired Immunity. *Proc. Roy. Soc. B* 143 : 58, 1954.
- Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B.: Quantitative Studies on Tissue Transplantation Immunity. III. Actively Acquired Tolerance. *Phil. Trans. Roy. Soc.* 239 : 357, 1956.
- Drinker, C. K., Yoffey, J. M.: *Lymphatics, Lymph and Lymphoid Tissue*. Cambridge, Mass. 1941.
- Cannon, J., Longmire, W.: Studies of Successful Skin Homografts in the Chicken. *Ann. Surg.* 135 : 60, 1952.
- Coons, A. H., Leduc, E. H., Connolly, J. M.: Studies on Antibody Production. I. A Method for the Histochemical Localization of Specific Antibody and its Application to a Study of the Hyperimmune Rabbit. *J. Exp. Med.* 102 : 49, 1955.
- Glick, B., Chang, T. S., Jaap, R. G.: The Bursa of Fabricius and Antibody Production. *Poultry Sci.* 35 : 224, 1956.
- Hašek, M.: Projevy vegetativního sblížení v adaptaci vyššího živočicha na cizorodé antigeny. *Čs. biologie* 3 : 327, 1954.
- Hašek, M., Hrabá, T.: The Significance of Phylogenetic Kinship in Immunological Approximation during Embryogenesis. *Fol. biol. (Praha)* 1 : 1, 1955.
- Holland, A. E.: *The Immune Response of the Fowl*. Zoological thesis, University of Edinburgh, 1956.
- Makinodan, T., Ruth, R. F., Wolfe, H. R.: Precipitin Production in Chickens. X. Cellular Changes in the Spleen During Antibody Production. *J. Immunol.* 72 : 39, 1954.
- Makinodan, T., Ruth, R. F., Wolfe, H. R.: Precipitin Production in Chickens. XI. Site of Antibody Production. *J. Immunol.* 72 : 45, 1954.
- Roberts, K. B.: In *Lectures on General Pathology*. Ed. Florey, Sir Howard. London 1954.
- Sterzl, J.: The Demonstration and Biological Properties of the Tissue Precursor of Serum Antibodies. *Fol. biol. (Praha)* 1 : 193, 1955.

## Адоптивная передача образования антител при помощи ткани селезенки у кур

Н. А. МИТЧИСОН

### *Резюме*

Домашняя птица хорошо подходит для иммунологических работ: она иммунологически активна, не дорога и работать с нею удобно. Еще одно ее преимущество в том, что не трудно ввести антиген и в зародыши для создания иммунологической совместимости (Hašek 1954, Billingham, Brent, Medawar 1956). Однако области образования антител у птиц окончательно не определены. Они могут быть сходны с этими структурами у млекопитающих, но не тождественны с ними, так как у куриных отсутствуют образования, гомологичные лимфатическим узлам (Drinker и Yoffrey 1941).

Наши опыты были поставлены аналогично опытам адоптивной передачи иммунитета у млекопитающих (Billingham, Brent, Medawar 1954). Ткань селезенки и костного мозга вынималась у иммунизированных взрослых кур и вприскивалась в полость брюшины молодым цыплятам. Если в этих тканях имеются клетки, образующие антитела, то их деятельность должна продолжаться и в новом хозяине. Молодые животные в качестве хозяев исследуемой на иммунологическую активность ткани удобны потому, что от одного донора ткань может быть перенесена на большое количество хозяев, а кроме того менее вероятно, что перенесенный с тканью антиген вызовет реакцию иммунитета (Штерцль 1955), и перенесенная ткань может выжить дольше, благодаря более медленной реакции хозяина на гомотрансплантат, и, наконец, естественные агглютинины, искажающие результаты опытов у взрослых реципиентов (Hollande 1956), у молодых могут присутствовать в более низких титрах.

Доноры ткани иммунизировались кроличьими и гомологичными эритроцитами. С кроличьими антигенами были получены более высокие титры антител, но в теле хозяев находились естественные агглютинины против них, тогда как против гомологичных эритроцитов у них естественных агглютининов нет. После переноса ткани селезенки (но не костного мозга) в крови реципиентов можно было найти антитела (титр агглютининов против кроличьих эритроцитов бывал выше, чем в контроле, так как здесь существуют и естественные гетероагглютинины). С помощью контрольных опытов было установлено, что эти антитела образуются именно перенесенными клетками, а не просто пассивно переносятся с тканью донора и не образуются собственными клетками хозяина. Отдельные опыты, как кажется, не очень разнились между собой по эффективности передачи. Способность к образованию антител утрачивалась хозяевами между 5-ым и 9-ым днем после переноса. Это отвечает гипотезе, что перенесенная ткань селезенки в теле хозяина подвергнется действию реакции на гомотрансплантат. Главнейший вывод из этих опытов заключается в том, что образование антител у домашней птицы протекает в селезенке. Кроме факта, что с тканью костного мозга не было возможно передать адоптивный иммунитет, не было получено никаких данных о том, является ли селезенка единственным местом, где образуются антитела. Отрицательные результаты опытов с костным мозгом не могут считаться окончательными, так как переносились лишь небольшие количества ткани, а ее трансплантационные свойства могут отличаться от свойств селезенки.

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. (1957) — Fasc. 2.

### Immunological Tolerance of Rats to Human Erythrocytes

J. GROZDANOVIČ

Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Department of Experimental Biology and Genetics, Praha

Received December 21, 1956

Descriptions of experiments attempting to produce immunological tolerance to human cells have so far been few and far between. Burnet, Stone and Edney (1950) attempted to evoke immunological tolerance in chick embryos which they injected with human erythrocytes as well as with other distant antigens. The results, however, were negative. Toolan (1955) injected rat embryos with a single injection of a homogenate of human tissues and then inoculated them at the age of 4–5 weeks with a transplantable human tumour. No difference, however, was found in the susceptibility of experimental and control animals. Wallace (1956) found no immunological tolerance in rats following intra-embryonal injection of cells of a HeLa tumour.

In the work described in the present communication an attempt was made to obtain immunological tolerance to human erythrocytes in rats by means of injections of washed blood cells during embryogenesis and postembryogenesis. In postembryogenesis repeated injections were also used.

#### Materials and Methods

White rats bred in the author's institute were used. A 40% and 70% suspension of thrice washed human blood cells in physiological saline was injected; these were obtained from freshly citrated blood. For immunisation and agglutination blood cells from preserved blood were used.

For the intra-embryonal injections pregnant rats weighing 140–160 g. were used. These were operated on under ether narcosis using the technique described in a previous communication (Grozdanovič 1956). The inoculum was injected the embryos subcutaneously, with the exception of the seventh experimental series, in which the last injection was made intraperitoneally.

The injections were carried out as follows: 1. Single intra-embryonal injection (series 1), 2. Single postembryonal injection (series 2), 3. Intra-embryonal injection supplemented by repeated postembryonal injections (series 3 and 4), 4. Repeated postembryonal injections (series 5, 6 and 7). The doses of inoculum for the individual series are given in tab. 1. In series 1–6, group B blood cells were used, in series 7, group A cells.

In series 1–6, immunisation of the experimental and control animals was commenced at the beginning of the seventh week and in series 7 at the beginning of the ninth week after birth; in series 1, 2, 3 and 5 group B cells were used and in series 7, group A cells, i. e. from the same group as that for the injections. In series 4 and 6 the animals were immunised with blood cells from group A, while the injections were carried out using group B blood cells (tab. 1). Immunisation was carried out with three 1 ml. doses of a 40% suspension of washed blood cells administered intraperitoneally at intervals of two days. Blood was collected by cardiac puncture ten days after the last dose.

The degree of immunological tolerance was ascertained by studying the titres of immune agglutinins. Agglutination was read off after 180 minutes at room temperature by means of a preparation microscope. In series 3–6 agglutination was carried out both with group B erythrocytes (used for the injections) and also with group A erythrocytes. In the second experimental series the presence of agglutinins was also determined before immunisation.

The agglutination results were evaluated by means of the t test.

Table 1. Experimental Scheme

Series No	Method of injection	Total dose antigen/animal and method of administration	Blood group			No. of animals	
			Injections	Immunisation	Agglutination	Experimental	Control
1	Intraembryonal 2 days before birth	0.1 ml. 40% suspension subcutaneously	B	B	B	7	7
2	Postembryonal 3 hours after birth	0.1 ml. 40% suspension subcutaneously	B	B	B	10	10
3	Intraembryonal + repeated postembryonal	0.1 ml. 2 days before birth. 1-5 days after birth 1.5 ml. 40% suspension s. c.	B	B	B, A	6	5
4	ditto	ditto	B	A	B, A	5	5
5	Postembryonal, repeated	1.6 ml. 1-5 days after birth, 40% suspension, s. c.	B	B	B, A	7	6
6	ditto	ditto	B	A	B, A	7	5
7	Postembryonal, repeated	4 ml. 1-16 days after birth. 1-15 s. c., 16th i. p. 70% suspension	A	A	A	8	9

Table 2

Animals	Titres of immune agglutinins							
Experimental	32,	32,	16,	16,	8,	8,	8	
Control	64,	32,	32,	16,	16,	16,	8	
	$P < 0.05 > 0.01$							

Table 3

Animals	Titres of immune agglutinins									
Experimental	64,	64,	32,	32,	32,	32,	16,	16,	16,	8
Control	128,	64,	64,	32,	32,	32,	16,	16,	16,	16
	$P > 0.05$									

### Results

*Series 1:* From two pregnant female rats seven six-week-old rats were obtained from a total of 12 which had been given intra-embryonal injections. Group B erythrocytes were used both for the injections and also for immunisation. The results are given in tab. 2. The difference between experimental and control animals borders on the limits of significance.

*Series 2:* Single postembryonal injections carried out by the method described in tab. 1 (No. 2) did not produce tolerance. Animals in which agglutinins had not been found prior to immunisation formed immune agglutinins following immunisation, the titres in the experimental and control animals being similar. The results are given in tab. 3.

*Series 3:* The injection of group B erythrocytes during embryogenesis, supplemented by postembryonal injections from the first to fifth day after birth (tab. 1, No. 3), caused a statistically significant reduction in the formation of immune agglutinins against blood cells of groups B and A following immunisation with group B erythrocytes (tab. 4).

*Series 4:* Similar results were obtained with a different arrangement (tab. 1, No. 4), in which the intra-embryonal and repeated postembryonal injections were carried out with group B erythrocytes and the animals were immunised with group A erythrocytes. The results are given in tab. 5.

Table 4

Animals	Titres of immune agglutinins									
	against B erythrocytes					against A erythrocytes				
Experimental	64,	32,	16,	8,	2,	16,	16,	4,	4,	4,
Control	256,	64,	64,	64,	32	128,	64,	64,	16,	8
	P > 0.001 < 0.01									

Table 5

Animals	Titres of immune agglutinins									
	against B erythrocytes					against A erythrocytes				
Experimental	32,	8,	8,	4,	2	16,	16,	8,	8,	2
Control	32,	32,	16,	16,	8	32,	32,	32,	16,	16
	P > 0.001 < 0.01									

Table 6

Animals	Titres of immune agglutinins									
	against B erythrocytes					against A erythrocytes				
Experimental	64,	64,	32,	32,	32,	64,	32,	32,	16,	16,
Control	64,	64,	32,	32,	32,	64,	64,	32,	16,	16,
	P > 0.05									

Table 7

Animals	Titres of immune agglutinins											
	against B erythrocytes						against A erythrocytes					
Experimental	64,	64,	32,	32,	32,	8,	2	64,	64,	32,	32,	32,
Control	64,	64,	32,	16,	8			64,	32,	32,	32,	16,
	P > 0.05											

Table 8

Animals	Titres of immune agglutinins against erythrocytes of group A									
Experimental	4,	4,	4,	4,	4,	2,	2,	2		
Control	64,	32,	32,	16,	16,	16,	16,	16,	16	
	P < 0.001									

*Series 5 and 6:* The same amount of suspension of group B erythrocytes, when administered only between the first and fifth days of postembryogenesis, did not lead to a weakening of the immunity response either after immunisation with group B erythrocytes (tab. 6) or with group A erythrocytes (tab. 7).

*Series 7:* On the basis of the previous findings, an extended series of postembryonal injections was carried out, from the first to the sixteenth day of life, using a 70% suspension of group A erythrocytes (for dosage tab. 1, No. 7). As compared with previous experiments, the increase in the amount of antigen administered brought about a highly significant weakening of the immunity response to group A erythrocytes (tab. 8).

### Discussion

As compared with previous results with induced immunological tolerance in rats to mouse cellular antigens (Bolag 1955, Grozdanovič 1956) or rabbit erythrocytes (Puza 1956), obtained by means of single injections of cell suspensions in embryogenesis or early postembryogenesis, this method did not produce significant tolerance to human blood cells. Repeated postembryonal injections of a 40% suspension of blood cells were likewise ineffective. If, however, repeated injections were used and the first injection was made during embryogenesis, or if a 70 % suspension was used and the volume of the dose was more than doubled, a significant decrease in the formation of immune agglutinins was obtained. At the same time it was found that the specific specificity of the human erythrocytes played a part in the production of tolerance, whereas the specific group differences (between groups A and B) had no effect.

In the author's laboratory a study has already been made of the production of immunological tolerance to heterologous cells and it was found that the degree of tolerance to heterologous cells was much lower than tolerance to homologous cells (Hašek 1954, Hašek and Hraba 1955). This finding is confirmed by other authors.

The degree of immunological tolerance was further found to depend on the amount of cells administered. In duck embryonic parabionts with hens, for example, embryonal parabiosis, in which a considerable amount of blood is exchanged, leads to a sig-

nificant decrease in the formation of immune agglutinins, but a single intra-embryonal injection of hen blood was not found to have any influence. Parabiosis between turkey and hen similarly leads to a very marked degree of tolerance as compared with that produced by injection (Hraba et al. 1956, Hašek 1956).

It was also found that repeated postembryonal injections of heterologous blood in ducks had a far greater influence on the formation of immune agglutinins than a single intra-embryonal injection (Hašková and Pokorná 1956).

As shown by results with the induction of homologous tolerance in rats (Woodruff and Simpson 1955) and by the previous results obtained by the author in the production of tolerance in rats to heterologous cells (Grozdanovič 1956), the adaptive immunological stage in rats continues into early postembryogenesis. In the present work tolerance in rats to human cells was produced on this basis. In order to obtain a significant decrease in the immunity response, however, in the case of human blood cells it was necessary to administer, in repeated doses, a far larger amount than in the case of mouse cells, the influence of which could be detected after a single injection; this is a logical outcome of the different taxonomic relationships between the donors and recipients.

This provides an explanation for the negative results of authors who used single injections of small amounts of human cells when attempting to produce tolerance in rats (Toolan 1955, Wallace 1956).

#### References

- Burnet, F. M., Stone, J. D., Edney, M.: The Failure of Antibody Production in the Chick Embryo. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 28 : 291, 1950.
- Bolag, W.: Heterologe Transplantation von Tumoren bei Vorbehandlung der Empfänger-tiere mit Gewebe der Spendertiere während der Embryonalzeit. *Experientia* 11, 6 : 227, 1956.
- Grozdanovič, J.: Imunologické sblížení krys vůči myšimu Crockerovu nádoru v embryog-  
nesi a postembryogenezí. *Čs. biologie* 5 : 300, 1956.
- Hašek, M.: Projevy vegetativního sblížení v adaptaci vyššího živočicha na cizorodé anti-  
geny. *Čs. biologie* 3 : 327, 1954.
- Hašek, M., Hraba, T.: The Significance of Phylogenetic Kinship in Immunological  
Approximation during Embryogenesis. *Fol. biol. (Praha)* 1 : 1, 1955.
- Hašek, M.: The Influence of Intra-embryonal Injections of Foreign Blood on the Formation  
of Antibodies. II. *Fol. biol. (Praha)* 2 : 48, 1956.
- Hašková, V., Pokorná, Z.: The Influence of Intra-embryonal and Repeated Post-  
embryonal Injections on the Formation of Heteroagglutinins. *Fol. biol. (Praha)* 2 : 249, 1956.
- Hraba, T., Hašková, V., Lengerová, A., Vojtíšková, M.: The Influence  
of Intra-embryonal Injections of Foreign Blood on the Formation of Antibodies. I. *Fol. biol.*  
*(Praha)* 2 : 43, 1956.
- Puza, A.: Sledovanie reaktivity krysy po intraembryonálnom injikovaní cudzodruhových  
krviniek. *Čs. biologie* 5 : 304, 1956.
- Toolan, H. W.: Attempt to Produce Tolerance in Rats to Human Tumors by Injection  
of These Animals in utero with Human Tissues. *Transpl. Bull.* 2 : 103, 1955.
- Wallace, A. C.: Attempts at Production of Actively Acquired Tolerance to Foreign  
Tumours. *Cancer Res.* 16 : 348, 1956.
- Woodruff, M. F. A., Simpson, L. O.: Induction of Tolerance to Skin Homografts  
in Rats by Injection of Cells from the Prospective Donor soon after Birth. *Brit. J. Exp. Path.*  
36 : 5, 1955.
- Гаšek, М.: Проявления вегетативного сближения в адаптации высших животных на чуже-  
родные антигены. *Чсл. Биология* 3 : 344, 1954.
- Грозданович, Я.: Иммунологическое сближение у крыс по отношению к мышинной  
опухолу Crocker-a в эмбриогенезе и постэмбриогенезе. *Fol. biol. (Praha)* 2 : 296, 1956.
- Пуза, А., Мольнар, И.: Исследования реактивности крысы после внутризароды-  
шевых впрыскиваний чужеродных кровяных телец. *Fol. biol. (Praha)* 2 : 300, 1956.

Иммунологическое сближение крыс по отношению  
к эритроцитам человека

Я. ГРОЗДАНОВИЧ

*Резюме*

Мы пытались вызвать у крыс иммунологическое сближение по отношению к эритроцитам человека. Мы производили, во-первых, одноразовые впрыскивания 40% взвеси промытых эритроцитов человека (0,1 мл под кожу) крысиным эмбрионам и новорожденным крысятам, а во-вторых, повторные впрыскивания, которые применялись в 3 модификациях: при первой мы делали сначала внутризародышевые впрыскивания (0,1 мл), а после рождения, с 1-го по 5-ый день, еще 5 впрыскиваний (в общем 1,5 мл). При втором способе мы вводили крысятам только после рождения, с 1-го по 5-ый день, в общем 1,6 мл взвеси, а при третьем, — начиная с 1-го до 16-ый день, в общем 4 мл взвеси. Концентрация взвеси эритроцитов бывала при 1-ой и 2-ой модификации 40%, а при 3-ей — 70%. В возрасте 7—9 недель животные иммунизировались 3 уколами по 1 мл 40% взвеси промытых эритроцитов в полость брюшины.

Ни одноразовые, ни повторные постэмбриональные впрыскивания 40% взвеси не вызывали иммунологического сближения, и титры иммунных агглютининов у опытных и контрольных животных колебались на одинаковом уровне. Только после внутризародышевых впрыскиваний наблюдалось слабое понижение образования иммунных агглютининов, остававшееся на границе статистической значимости. С другой стороны, мы добивались значительного ослабления образования иммунных агглютининов с помощью повторных впрыскиваний, если первое из них, — внутризародышевое, — бывало дополнено пятью постэмбриональными, а также при повторных постэмбриональных уколах 70% взвеси. Снижение реактивности касалось как эритроцитов группы крови В, применявшейся для сближения, так и эритроцитов группы А. Таким образом, в процессе иммунологического сближения с эритроцитами человека имела значение прежде всего их видовая специфичность, тогда как групповая специфичность не оказывала влияния.

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. (1957) — Fasc. 2.

### The Influence of Chlortetracycline on the Activity of $\alpha$ -amylase of the Production Strain of *Actinomyces aureofaciens*

J. ROKOS, M. BURGER and P. PROCHÁZKA

Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Department of Microbiology, Praha

Received December 20, 1956

In the previous work, the inhibitory influence of chlortetracycline on the  $\alpha$ -amylase of the fungus *Aspergillus oryzae* (Burger, Rokos and Procházka 1956) was ascertained. A simple method for counteracting this inhibitory influence was elaborated, by means of which the concentration of  $\alpha$ -amylase at a given moment can be measured in a substrate in which chlortetracycline is present.

In the present work a study was made of whether the inhibitory influence of chlortetracycline on the activity of  $\alpha$ -amylase also takes effect on  $\alpha$ -amylase from other biological sources. In the first place the investigations were directed at ascertaining whether inhibition of the  $\alpha$ -amylase of the production strain of *Actinomyces aureofaciens* occurs during the fermentation preparation of chlortetracycline. A study was therefore made of the course of activity of  $\alpha$ -amylase during cultivation of the strain producing chlortetracycline and of the degree of inhibition of  $\alpha$ -amylase by the antibiotic. Further, the influence of chlortetracycline on the activity of pancreatic  $\alpha$ -amylase was studied.

#### Materials and Methods

**Analytical Methods.** The analytical methods were described in the previous communication (Burger, Rokos and Procházka 1956). One unit of pancreatic  $\alpha$ -amylase corresponds to the amount of enzyme in 1 ml. solution required to dextrinate 1 g. starch in one hour. In the  $\alpha$ -amylase of the production strain, one unit is 1,000 times smaller, as it is related to 1 mg. dextrinated starch. The activity is related to 1 ml. of the original solution of the enzymatic preparation. In the case of *Actinomyces aureofaciens* this is 1 ml. filtrate of the culture fluid and in the case of pancreatic  $\alpha$ -amylase 1 ml. of the basic solution of the enzyme obtained by purification of the pancreatic extract.

**Method.** Pancreatic  $\alpha$ -amylase was prepared according to the method of Meyer, Fischer and Bernfeld (1947), to the second degree of super-purification. The incubation solutions of pancreatic  $\alpha$ -amylase were regulated by means of a phosphate buffer with a final concentration of  $7.5 \times 10^{-3}M$  and contained 0.1 % NaCl. The pH of the solution was maintained at 6.5.

The cultivation conditions of the production strain of *A. aureofaciens* have been described in an earlier communication (Rokos, Řiřica and Procházka 1955). The solution of the  $\alpha$ -amylase of *Actinomyces aureofaciens* was obtained by filtering off the culture. The incubation mixtures contained a phosphate buffer with a final concentration of  $2.5 \times 10^{-2}M$ . In all the experiments a constant pH of 6.0 was maintained. The amount of enzymes used in the incubation mixtures was selected in such a way that dextrination of the starch took about 60 minutes. Otherwise the method did not differ from that described in connection with the previous work (Burger, Rokos and Procházka 1956).

#### Results

##### The Influence of Chlortetracycline on Pancreatic $\alpha$ -amylase

Chlortetracycline slows down the activity of pancreatic  $\alpha$ -amylase in a way similar to that in which it slows down the activity of the  $\alpha$ -amylase of the fungus

*A. oryzae*. Fig. 1 shows the course of the transmission of the iodine-starch complex during hydrolysis of the starch by pancreatic  $\alpha$ -amylase, in the presence and absence of chlortetracycline. The activity of pancreatic  $\alpha$ -amylase in the absence of chlortetracycline was 222 units. In the presence of 1,000  $\mu\text{g}$ . chlortetracycline/ml. solution it was 60 units.

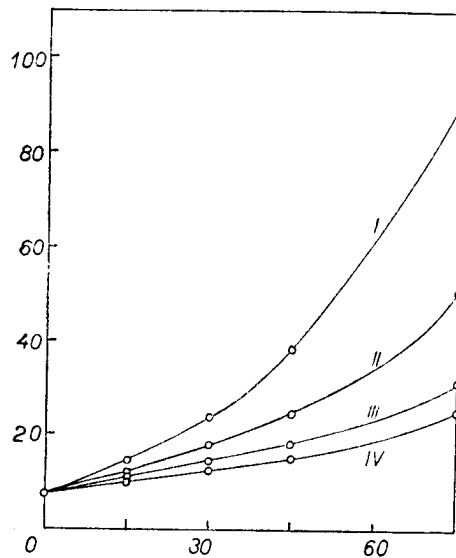


Fig. 1. Influence of concentrations of chlortetracycline on the inhibition of pancreatic  $\alpha$ -amylase.  $x$ : time in minutes.  $y$ : transmission %. I: control, II: 600  $\mu\text{g}$ ., III: 800  $\mu\text{g}$ ., IV: 1,000  $\mu\text{g}$ ., chlortetracycline/ml.

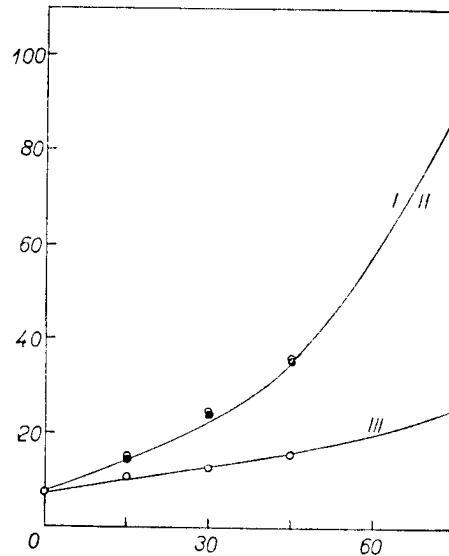


Fig. 2. Influence of citrate on inhibition of pancreatic  $\alpha$ -amylase by chlortetracycline.  $x$ : time in minutes.  $y$ : transmission %. Final concentration of Na citrate  $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ . I: control, II: 1,000  $\mu\text{g}$ . chlortetracycline and Na citrate, III: 1,000  $\mu\text{g}$ . chlortetracycline/ml.

In the previous communication it was demonstrated that inhibition produced by chlortetracycline can be counteracted by citrate and other anions of organic acids. In the case of this amylolytic system it was also investigated whether citrate would have the same effect. Fig. 2 shows that the presence of citrate, in the same concentration as used in the previous work, abolishes the inhibitory effect of chlortetracycline. The inhibitory effect of chlortetracycline on pancreatic  $\alpha$ -amylase, therefore, displays the same features as in the case of  $\alpha$ -amylase from *A. oryzae*.

#### The Influence of Chlortetracycline on the Activity of $\alpha$ -amylase of the Production Strain of *Actinomyces aureofaciens*

It is known from the work of several authors (Bois and Savary 1945, Waksman 1950) that a number of actinomycetes produce  $\alpha$ -amylase. Simpson and McCoy (1953) studied the production of  $\alpha$ -amylase in five species of actinomycetes. These authors found that the starch in the substrate was hydrolysed only by  $\alpha$ -amylase, while maltase was not present. The production of  $\alpha$ -amylase was not studied, however, in the production strain of *A. aureofaciens*. In this strain, the presence of  $\alpha$ -amylase in the substrate was also determined, but maltase was not ascertained. Our preceding experiments showed that in this case inhibition of  $\alpha$ -amylase by chlortetracycline must be reckoned with. Before studying the course of the activity of  $\alpha$ -amylase

during cultivation of *A. aureofaciens*, therefore, the effect of adding chlortetracycline to the solution was first observed, together with an investigation of whether possible inhibition could be abolished by citric acid.

To a filtrate of fermentation fluid from a 72-hour culture, 1,000  $\mu\text{g}$ . chlortetracycline was added to 1 ml. final volume of substrate and the degree of inhibition was

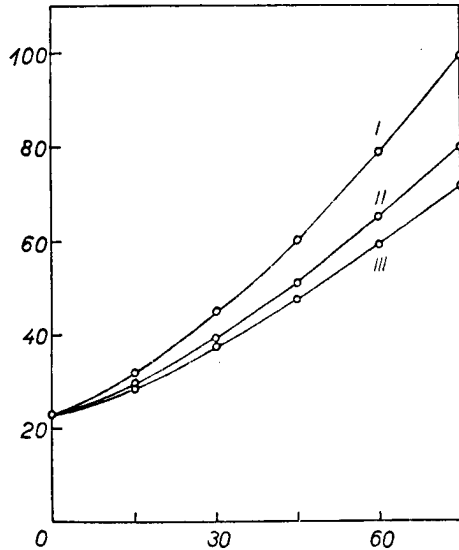


Fig. 3. Influence of chlortetracycline on activity of  $\alpha$ -amylase of *Actinomyces aureofaciens* and influence of citrate on inhibition of  $\alpha$ -amylase of *Actinomyces aureofaciens* by chlortetracycline.  $x$ : time in mins.  $y$ : transmission %. Final concentration of Na citrate  $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ . I: control, II: 1,000  $\mu\text{g}$ . chlortetracycline and Na citrate, III: 1,000  $\mu\text{g}$ . chlortetracycline/ml.

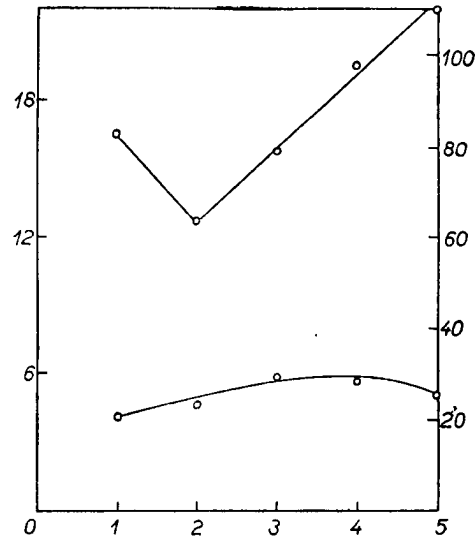


Fig. 4. Course of activity of  $\alpha$ -amylase of *Actinomyces aureofaciens* and inhibition by chlortetracycline during cultivation.  $x$ : fermentation in days; activity and inhibition determined at 24-hour intervals.  $y_0$ : units of  $\alpha$ -amylase activity,  $y_s$ : inhibition of  $\alpha$ -amylase by chlortetracycline as a % of decrease in activity as compared with the control. Above: course of activity of  $\alpha$ -amylase, below: course of measure of inhibition of  $\alpha$ -amylase of *A. aureofaciens* during cultivation.

determined. In a parallel experiment citric acid was also added. Fig. 3 shows that the same concentration of chlortetracycline inhibited the  $\alpha$ -amylase of the production strain of *A. aureofaciens* far less than the  $\alpha$ -amylase of *A. oryzae* and pancreatic  $\alpha$ -amylase. In this case, chlortetracycline reduced activity by only 26%. The addition of citric acid also had only very little effect.

These results show that the  $\alpha$ -amylase of a strain of *A. aureofaciens* producing chlortetracycline differs basically from fungous and pancreatic  $\alpha$ -amylase as regards inhibition by chlortetracycline.

The course of the activity of  $\alpha$ -amylase of the production strain of *A. aureofaciens* during submerged fermentation of chlortetracycline on a reciprocal shaker is shown in fig. 4 and tab. 1. Fig. 4 shows that the addition of 1,000  $\mu\text{g}$ . chlortetracycline to a filtrate of the culture reduced activity on an average by 25%.

#### Discussion

It is known (Waksman 1950) that when culturing actinomycetes on a starchy substrate,  $\alpha$ -amylase accumulates in the medium. Simpson and McCoy (1953) made a detailed study of the type of the amylolytic ferments in a number of strains of

Table 1. Course of activity of  $\alpha$ -amylase of *Actinomyces aureofaciens* during fermentation, inhibition of  $\alpha$ -amylase by chlortetracycline and abolishment of inhibition of  $\alpha$ -amylase by citric acid.

Production of chlortetracycline during fermentation

Hours of fermentation	Production of chlortetracycline in $\mu\text{g.}$	Additions		
		0 (controls)	chlortetracycline	chlortetracycline + citric acid
24	—	16.6	13.2	13.1
48	1,210	12.7	9.7	9.7
72	1,430	15.8	11.6	13.1
96	1,030	19.5	13.9	16.0
120	—	22.1	16.4	17.3

Final concentration of added chlortetracycline  $2 \cdot 10^{-3}\text{M.}$

Final concentration of Na citrate  $2 \cdot 10^{-2}\text{M.}$  Expressed in  $\alpha$ -amylolytic units.

actinomycetes. They found that these strains produced a typical  $\alpha$ -amylase, but not maltase. In the production strain of *A. aureofaciens*, amylase was also found alone in the substrate, without maltase. The course of the activity of this enzyme during fermentation of chlortetracycline is given in the experimental part of the communication.

In contrast to the study of the amylases of non-productive strains, the question arose in connection with the productive strain of whether the chlortetracycline which accumulates in the substrate does not influence the activity of the  $\alpha$ -amylase. This appeared to be probable, when considering that concentrations of chlortetracycline from  $400 \mu\text{g./ml.}$  upwards had an inhibitory effect on  $\alpha$ -amylase from other sources, e. g. from the fungus *A. oryzae* and pancreatic  $\alpha$ -amylase. By means of the method for abolishing inhibition (acids, dialysis) it was found that in very high concentrations ( $1,400 \mu\text{g./ml.}$ ) chlortetracycline had very little effect on the activity of  $\alpha$ -amylase of the production strain.

The  $\alpha$ -amylase of the production strain is quite different, therefore, from the  $\alpha$ -amylase of the fungus *A. oryzae* and pancreatic  $\alpha$ -amylase in its relationship to chlortetracycline. This is an interesting fact, when we consider that the mechanism of the decomposition of starch by  $\alpha$ -amylases from various sources is fundamentally the same (Myrbäck 1951). It is known, however, that in some respects the various  $\alpha$ -amylases nevertheless differ (e. g. as regards optimal pH and temperature, relationship of dextrination and saccharification, affinity to varying lengths of chains in the substrate, etc). Some properties of  $\alpha$ -amylases are labile and depend on the culture conditions. Campbell (1955) found that the  $\alpha$ -amylases of thermophilic facultative bacteria, when cultured at various temperatures, differed only in their resistance to high temperatures. When cultured at  $55^\circ\text{C}$ , isolated and super-purified  $\alpha$ -amylase was resistant to a temperature of  $90^\circ\text{C}$ , but after being cultured at  $30^\circ\text{C}$  (under otherwise the same conditions) the  $\alpha$ -amylase lost this resistance. It is very probable that in our case also the resistance of  $\alpha$ -amylase to chlortetracycline is due to an adaptive change in the  $\alpha$ -amylase as a result of the influence of the chlortetracycline in the medium. It will therefore be important to ascertain whether the  $\alpha$ -amylase of a non-productive strain will display the same characteristics in this connection as the  $\alpha$ -amylase of the productive strain.

It was found that in the early phase of cultivation of the production strain the general metabolism of the strain is affected if chlortetracycline is added in a given concentration (Boretti and Raggi 1955). At this stage chlortetracycline influences metabolism in a number of ways. It will be of interest to determine whether, at this

stage, manifestations of adaptation do not occur in some enzymatic systems under the influence of chlortetracycline. Our work indicates that such an effect might occur in the  $\alpha$ -amylase of the production strain. A direct reply to this question is expected from a comparison of the influence of chlortetracycline on the  $\alpha$ -amylase of the productive and non-productive strains of *A. aureofaciens*; this will be the subject of the further work.

The results demonstrate that in the production of chlortetracycline inactivation of the enzymatic system responsible for the decomposition of starch does not occur and that in this respect the prerequisite conditions are present for the complete utilization of the carbohydrate substrate (i. e. also of starch) during fermentation.

In the course of treatment with chlortetracycline, digestive difficulties are known to develop (McLean 1951, Kleitsch 1951, Leland et al. 1951, Müller and Vogl 1952, Siegel 1952). It may be assumed that these symptoms are due to the complex action of chlortetracycline. The fact that in experiments in vitro chlortetracycline was found to have a strong inhibitory effect on pancreatic  $\alpha$ -amylase, which could be abolished by citrate, will stimulate the authors to investigate in detail the question of whether the above-mentioned symptoms are not due, at least in part, to inhibition of the digestive enzymes in the alimentary tract and whether they cannot be abolished or at any rate mitigated.

#### Summary

The inhibitory influence of chlortetracycline on the dextrination activity of pancreatic  $\alpha$ -amylase was demonstrated. This inhibition is reversible and can be abolished by the anions of organic acids. On the other hand it was found that high concentrations of chlortetracycline (1,400  $\mu\text{g./ml.}$ ) have very little effect on the activity of the  $\alpha$ -amylase of the production strain of *A. aureofaciens*. This  $\alpha$ -amylase, therefore, is quite different from the  $\alpha$ -amylase of the fungus *Aspergillus oryzae* and from pancreatic  $\alpha$ -amylase in its relationship to chlortetracycline. A study was made of the course of the activity of  $\alpha$ -amylase during fermentation of chlortetracycline by the production strain of *Actinomyces aureofaciens*.

#### References

- Bois, E., Savary, J.: Les amylases des microorganismes. Can. J. Research B 23 : 208, 1945.
- Boretti, G., Raggi, F.: Effetto della chlortetraciclina sulla respirazione dello *Streptomyces aureofaciens*. Giorn. Microb. 1 : 224, 1955.
- Burger, M., Rokos, J., Procházka, P.: Effect of Chlortetracycline on the Activity of  $\alpha$ -amylase. Fol. biol. (Praha) 2 : 320, 1956.
- Campbell, L. L., Jr.: Purification and Properties of an  $\alpha$ -amylase from Facultative Thermophilic Bacteria. Arch. Bioch. Biophys. 54 : 154, 1955.
- Kleitsch, W. P.: Fatal Gastric Hemorrhage Following Aureomycin. Am. J. Digest. Dis. 18 : 166, 1951. Ref. J. A. M. A. 147 : 83, 1951.
- McLean, G.: Aureomycin Administered with Antacids. Am. J. Digest. Dis. 18 : 35, 1951. Ref. Am. Profess. Pharm. 17 : 832, 1951.
- Leland, J. L., Allebach, N.: Aureomycin and Penicillin in the Treatment of Bacterial Pneumonia. A Comparative Study. N. Y. St. J. Med. 51 : 1159, 1951. Ref. Abstr. World Med. 10 : 517, 1951.
- Meyer, K. H., Fischer, E. H., Bernfeld, P.: Sur les enzymes amylolytiques I. L'isolement de l'alpha amylase de pancréas. Helv. Chim. Acta 30 : 64, 1947.
- Müller, R., Vogl, H.: Nebenwirkungen von Aureomycin, Chloromycetin und Terramycin. Ref. Ars. Med. 42 : 179, 1952.
- Myrbäck, K., Neumüller, G.: Ergebnisse der Enzymforschung. Leipzig 12, 1951.
- Rokos, J., Řičica, J., Procházka, P.: Studium produkce chlortetracyklinu u *Actinomyces aureofaciens* I. Čs. biologie 4 : 333, 1955.

- Siegel, A. C.: The Rectal Administration of Aureomycin in Children. New England J. Med. 246 : 447, 1952. Ref. Medical Times 80 : 727, 1952.
- Simpson, F. J., McCoy, E.: The Amylases of Five Streptomycetes. Appl. Microbiol. 1 : 228, 1953.
- Waksman, S. A.: The Actinomycetes. Waltham, Mass. 1950.
- Рокос, И., Ржищица, Я., Прохазка, П.: Изучение продукции хлортетрациклина у *Actinomyces aureofaciens*. I. Fol. biol. (Praha) 1 : 214, 1955.

## Влияние хлортетрациклина на активность $\alpha$ -амилазы производственного штамма *Actinomyces aureofaciens*

И. РОКОС, М. БУРГЕР и П. ПРОХАЗКА

### Резюме

Мы изучали подавляющее действие хлортетрациклина на  $\alpha$ -амилазу из поджелудочной железы и на  $\alpha$ -амилазу штамма *Actinomyces aureofaciens*, образуемую им при глубокой культивации. С помощью выработанного нами простого метода возможно устранить его подавляющее влияние и измерять концентрацию  $\alpha$ -амилазы в данную минуту непосредственно в субстрате, в присутствии хлортетрациклина.

Мы доказали также подавляющее действие хлортетрациклина на декстринирующую активность панкреатической  $\alpha$ -амилазы. Это подавление оказывается обратимым и устраняется также анионами органических кислот.

С другой стороны, мы установили, что хлортетрациклин и при очень высоких концентрациях (1400  $\mu$ /мл) оказывает лишь незначительное действие на активность  $\alpha$ -амилазы производственного штамма *A. aureofaciens*. Таким образом, по влиянию на нее хлортетрациклина эта амилаза весьма отличается от  $\alpha$ -амилазы плесневого грибка *Aspergillus oryzae* и поджелудочной железы. Это обстоятельство тем более интересно, что метаболизм расщепления крахмала  $\alpha$ -амилазами из различных источников в принципе одинаков.

Возможно, что в нашем случае устойчивость  $\alpha$ -амилазы к хлортетрациклину обусловлена адаптивными изменениями  $\alpha$ -амилазы под влиянием хлортетрациклина в среде.

## F O L I A   B I O L O G I C A

Tom. III. (1957) — Fasc. 2.

---

### New Findings in the Use of Fungous Amylolytic Preparations for the Saccharification of Potato Mash

#### Semi-pilot Plant Experiments with Fungous Preparations in the Production of Alcohol from Potatoes

K. BERAN, M. BURGER and S. ZELENKA

Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Department of Microbiology, Praha,  
Chemical and Technological University, Faculty of Food Technology,  
Department of Carbohydrate Technology, Praha

Received November 3, 1956

Many research workers have for a long time been interested in the use of fungous amylolytic preparations in the distilling industry. They have been attempting to find a complete or partial substitute for the malt required in the saccharification of starchy raw materials. A number of communications demonstrate that fungous amylolytic preparations can be successfully used in place of malt in the treatment of starchy raw materials for alcohol.

Interest centres particularly round two species of fungus of the genus *Aspergillus*: *A. niger* and *oryzae*. For the technological process, preparations of these fungi, grown on solid substrates, especially on bran, can be used (Lu Cheng Hao et al. 1943, Roberts et al. 1944, Underkofler et al. 1939, 1946, Schwene et al. 1940), and also preparations grown submerged in fluid substrates. Dried and enriched crushed starch was also used as a substrate (Sova 1950). For culturing in fluid media, *A. niger* has chiefly been used (Le Mense et al. 1949, Teixeira et al. 1950, Adams et al. 1947). It has been demonstrated in a number of communications that the yield of alcohol is at least the same as compared with malt, and in most cases is from 2—12% higher (Lu Cheng Hao and Jump 1945, Teixeira et al. 1950, Roberts et al. 1944, Adams et al. 1947, Underkofler et al. 1939, 1946). A mixture of malt and fungous preparation also gave a higher yield in the saccharification of cereals. The use of a mixture has no other advantages. Higher yields were not obtained, however, on using the mixture in the saccharification of potato mash (Malcher 1954).

The maximum yield of alcohol depends on two consecutive processes—on completion of the actual process of saccharification and on the phase of completion of fermentation, when the dextrans which develop during saccharification are further broken down into fermentable sugars (Pan et al. 1950).

On studying both these phases of the breaking down of starch and dextrans by fungous preparations of *A. niger* and *A. oryzae*, it was found that the optimal temperature is an important factor in hydrolysis of the intact molecule. The optimal temperature for 60 minutes' saccharification of potato mash using a preparation of *A. oryzae* is 55° C and for *A. niger* 65° C (Beran and Burger 1956, Burger and Beran 1956a). Maintenance of the temperature is especially important with preparations of *A. niger*, as the hydrolytic activity of this preparation is strongly activated by

heat. Its activity for the formation of fermentable sugars in the hydrolysis of starch was 7.34 times greater at 65° C than at 30° C, whereas with *A. oryzae* it was only 2.54 times greater at 55 °C (Burger and Beran 1956a). These preparations also differ in their optimal pH for dextrination of starch. For preparations of *A. oryzae* the value was found to be 6.1, whereas for *A. niger* it was 4.5 (Beran and Burger 1956). The possibility of using this low pH in preparations of *A. niger* is of great importance for the technology of agricultural distilleries.

In connection with the second phase of the formation of fermentable sugars from dextrin, it was found that preparations of *A. niger* caused more intensive hydrolysis of dextrans than *A. oryzae*. Simultaneously with fermentation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* R XII, 91.2% fermentable sugars developed from the "limit" dextrans present, through the action of *A. niger* preparations and 73.6% with preparations of *A. oryzae*. It was further found that preparations of *A. niger* gave rise to more intensive formation of non-fermentable oligosaccharides with a 1,6-glucoside link (isomaltose, panose), but it also markedly breaks down these oligosaccharides. This enzymatic system which breaks down 1,6-glucoside links is doubtless of great importance for the yield of alcohol. With *A. oryzae*, however, this hydrolytic activity is not evident (Burger and Beran 1954).

Whereas the question of a complete substitute for malt in treating cereals is regarded as settled, according to numerous communications, in the treatment of potatoes in Czechoslovakia and elsewhere (Malcher 1954, Sotnichenko 1955) only partial substitution has been used, i. e. a mixture of dried diastatic malt with an amylolytic fungous preparation, in an attempt to obtain a good yield of alcohol and avoid technological difficulties. By their recent communication on the optimal conditions for the saccharification of potato mash and by means of the work described in the present communication, the authors are attempting to fill in this gap and to find a complete substitute for malt. The present work verifies in practice the theoretical results obtained by the authors.

#### Materials and Methods

*Micro-organisms used:* In the preparation of amylolytic fungous preparations, the same two species of fungus (*Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*) were used as in the previous work (Burger and Beran 1954, 1956). For fermenting sweet mashes, baker's yeast of the first generation was used. In laboratory experiments for testing the yield, *Saccharomyces cerevisiae* R XII was used. The yeast cells were cultured in 10° S wort at 28° C.

*Basic raw materials:* The fungi were cultured on wheat bran. For the experiments, potatoes of the same sort were used (Rapid E4), with a starch content of 20%. The control amylolytic preparation was green 8-day-old brewer's malt prepared from second grade barley. In laboratory experiments for testing the yield, dried diastatic malt was used. The mashes for laboratory experiments were prepared from potato flakes with a starch content of 65.68%.

*Preparation of amylolytic fungous preparations:* For the saccharification of mashes in semi-pilot plant experiments, air-dried, ground cultures of the fungi *A. niger* and *A. oryzae* grown on sterile bran were used. The preparation of the preparations used in laboratory experiments has been described in a previous communication (Burger and Beran 1954). When preparing the preparations, aluminium or enamelled dishes were used, lined with a thin layer of sterile bran (2.5 cm.). Inoculation of the bran was carried out by evenly sprinkling the surface with a mixture of spores and sterile bran.

The spore inoculum was prepared from healthily sporulating cultures of fungi grown in Roux bottles on 10°S wort thickened with agar. The spores were removed from the surface of the culture by means of sterile bran and this mixture was used for inoculating the bran in the actual preparation of the preparations. The bran was sterilised twice in 24 hours at a pressure of one atmosphere.

The inoculated bran was moistened with the same weight of sterile water and placed in a thermostat. Culturing was carried out at 25° C for 3—4 days. In some cases it was necessary to re-moisten the culture with sterile water during cultivation.

*Preparation of the mash and methods of laboratory experiments for testing the yield:* Preparation of the mash from potato flakes has already been described (Beran and Burger 1956). In contrast to this method,

the volume of mash in experiments for testing the yield amounted to 200 ml., using 500 ml. flasks. The mash contained 15% starch and the amount of added preparations amounted to 15% of the weight of the starch. The preparations were added in two instalments, 10% of the weight of the starch on saccharification and 5% before fermenting. Saccharification was carried out for one hour at 50° C with preparations of *A. oryzae* and at 60° C with *A. niger*. Fermentation of the mash was carried out using 10 ml. of yeast suspension, so that the final concentration of the dry weight of the yeast amounted to 0.6%. The flasks were stoppered with a fermentation stopper and placed in a thermostat. Fermentation was carried out at 28° C for 48 hours.

**Apparatus:** Semi-industrial experiments were carried out in the experimental distillery of the Chemical and Technological University in Prague. The following apparatus was used in the distilling process: 1. A Henze vat for a maximal amount of 200 kg. potatoes, 2. a mashing tun of normal construction with a capacity of 400 litres, 3. small fermenting vats with a capacity of 800 litres, two entirely of wood and two of wood lined with copper sheeting, 4. a fractional distilling apparatus with a boiler, with a working capacity of about 300 litres.

**Mashing the potatoes and saccharification of the mash:** Washed potatoes weighing 140 kg. were mashed in the Henze vat in the usual way. The water of condensation was not run off. Before running off the mash into the fermenting vats, the water of condensation was extracted from the mashing vat and cooled to the temperature maintained during running off of the mash; the first part of the amylolytic preparation was then mixed with this water. After running off about one half of the mash, another part was added and on completing this and adjusting the saccharification temperature, a third part was added. The differences as compared with this basic method are given when describing the individual experiments. Before being added to the mash, the preparations were moistened with water. The mash was maintained at saccharification temperature for one hour. In some cases it was acidified with sulphuric acid to a pH of 4.5.

**Fermentation:** Following saccharification, the mash was cooled to an inoculation temperature of 22–25° C. Fermentation was carried out with ½ kg. of compressed yeast mixed with water. Fermentation took 72 hours.

**Analytic methods:** The starch content of the potatoes was determined densimetrically. Control of the mash was carried out macroscopically, and of the degree of mashing by the microscopic determination of the starch. It was found that mashing was complete in all the tuns. Saccharification was observed microscopically by the iodine test. The usual methods were employed to determine saccharification, titratable acidity, the pH, the progressive development of alcohol, alcohol in the residue, alcohol after fresh fermentation and alcohol after inversion. In laboratory experiments for determining the yield, alcohol was determined pycnometrically after two distillations. In the matured mash, the intact diastase was determined by the method of Ellrodt. Determination of the degree of reduction was carried out using the method of Schoorl (Schoorl and Regenbogen 1917). The amount of reducing substances is expressed as glucose. For making chromatographic analyses, the method of Green and Stone (1952) was used as modified by the authors. The standards taken were the chromatograms of wort and maltose, incubated with a preparation of *A. niger*, in which the distribution of the sugars is known. When making a chromatographic analysis of sweet mashes, half the number of samples were placed on chromatographic paper as for fermenting and matured mashes. Purity of fermentation was also observed microscopically.

## Results

Tab. 1 gives the results of laboratory experiments.

The table shows that yields obtained with preparations of *A. niger* or a mixture of preparations of *A. niger* and *A. oryzae* are approximately 6% higher than with malt. The results obtained with preparations of *A. oryzae* alone are approximately the same as those obtained with malt.

Table 1. Laboratory Experiments for Testing Yield

Amylolytic preparation	Malt	<i>A. niger</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i> + + <i>A. oryzae</i>
Yield (% theory)	85.7	91.4	81.2	92.1

Table 2. Analysis of Sweet Mash Saccharified with Malt and Course of Fermentation. Tun No.1

Time of fermentation	Hours			
	0	24	48	72
Saccharification (S °)	17.25	8.25	3.25	2.90
Temperature (° C)	22	27	26	23
Titrateable acidity	0.2	0.32	0.6	0.95
pH	5.4	5.0	4.3	4.1
Reducing substances (%)	6.98	2.09	0.55	0.32

Table 3. Analysis of Sweet Mash Saccharified with Malt and Course of Fermentation. Tun No.2

Time of fermentation	Hours			
	0	14	28	72
Saccharification (° S)	15.90	12.80	3.55	2.4
Temperature (° C)	22	22	27	24
Titrateable acidity	0.25	0.28	0.57	0.92
pH	5.5	5.4	4.6	4.2
Reducing substances (%)	6.54	3.82	0.43	0.28

## Semi-pilot plant Experiments

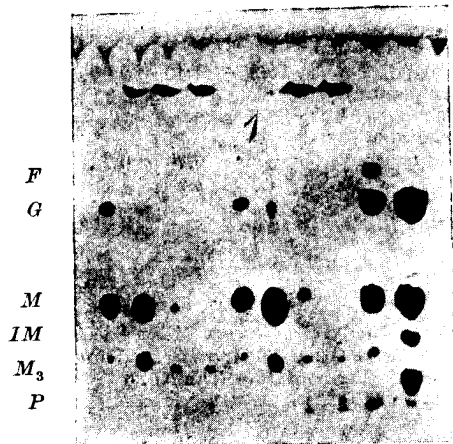
*Saccharification of potato mash with malt:* The amount of green malt used in the experiments corresponded to 15.9% of the starch present. During extraction, a temperature of 40° C was maintained in the mashing tun. Saccharification was carried out for one hour at 49° C. The iodine test which was made during this period showed complete saccharification of the mash. The results from vats 1 and 2 are given in tabs. 2, 3, 8 and 9 and in fig. 1.

As seen from tabs. 2 and 3, saccharification of the sweet mash in tun No. 1 was 17.25° S and in vat No. 2, 15.9° S. The course of titrateable acidity and, in particular, of the pH, shows a quite considerable increase in acidity during fermentation, which did not, however, exceed the limits usual in ordinary production. This increase in titrateable acidity, which was also manifested by a fall in the pH to below 4.5, was due to mild infection. As a result, when fermentation was complete, the Ellrodt test showed the presence of only a small amount of active diastase. The values of the reducing substances (% glucose) in the 72nd hour of fermentation and the chromatogram made at the same time show that the fermentable sugars had completely fermented out. The chromatograms also show that maltotriose did not completely ferment out and that something of the higher oligosaccharides also remained. The incomplete fermentation of maltotriose is evidently associated with less satisfactory properties of the yeasts that were used. Tab.8 gives analyses of the residues. These values show that both saccharification of the starch and fermentation of the mash were successful.

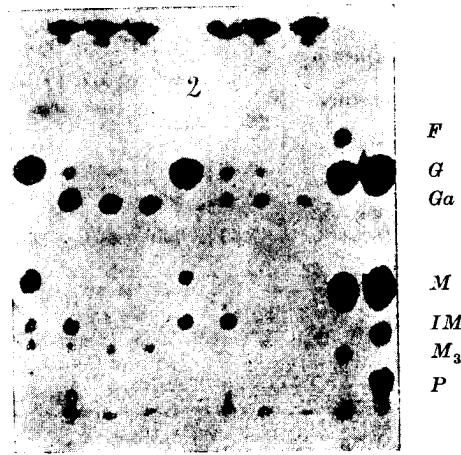
*Saccharification of potato mash with a combination of preparations of *A. niger* and *A. oryzae*:* The procedure in preparing mashes 3 and 4 was somewhat different. In the case of mash No. 3, the first part of the preparation of *A. oryzae* was added at the commencement of extracting the mash into the condensation water at a temperature of 55° C. During extraction, the temperature in the mashing tun was maintained at 50—55° C. The second part of the preparation of *A. oryzae* was added when extraction was complete and the mash was then left for 15 minutes at a temperature of 55° C. The preparation of *A. niger* was then added. The iodine test showed that saccharification at the end of this period (about 20 minutes after completing extraction) was already complete. Acidity was adjusted to a pH of 5.0 and the mash cooled to fermentation temperature. The mash showed saccharification of 16.4° S and was much more fluid than mashes prepared with malt. The total amount of the prepara-

tions used was 17.6% of the weight of the starch, and of this amount, 8.8% was accounted for by the preparation of *A. oryzae* and 8.8% by the preparation of *A. niger*.

In the fourth mash the procedure was the same up to leaving for 15 minutes at 55° C, only with the difference that the whole amount of the preparation



Hrs 0 24 48 72 0 14 38 72  $S_1$   $S_2$   
Tun 1 Tun 2  
Fig. 1. Chromatographic Study of Fermentation of Mashess Saccharified with Malt.



Hrs 0 24 48 72 0 14 38 72  $S_1$   $S_2$   
Tun 3 Tun 4  
Fig. 2. Chromatographic Study of Fermentation of Mashess Saccharified with a Mixture of Preparations of *A. niger* and *A. oryzae*.

F: fructose, G: glucose, Ga: galactose, M: maltose, IM: isomaltose,  $M_3$ : maltotriose, P: panose,  $S_1$ : maltose incubated with a preparation of *A. niger*,  $S_2$ : wort.

of *A. oryzae* was added at once, at the commencement of extraction. When the mash had been left for 15 minutes, the temperature was raised to 65° C and the preparation of *A. niger* added and the pH of the mash was adjusted to a pH of 4.5 by adding diluted sulphuric acid. The mash was then saccharified at the given temperature for 45 minutes. Saccharification of the mash showed a value of 15.3° S and the mash itself was much more liquid than mashess prepared with malt. The total amount of preparations used came to 11.3% of the weight of the starch, of which the preparation of *A. oryzae* accounted for 3.9%. The results of these experiments are given in tabs. 4, 5, 8 and 9 and in fig. 2.

As seen from the values obtained in a study of the course of fermentation (tabs. 4 and 5) and from an analysis of the residue (tab. 8), hydrolysis of the starch and dextrins was better than on using malt. As compared with malt, the fall in the value of the pH was smaller, even when the pH fell below 4.5. Microscopically, infectious micro-organisms were found only once. These results also explain the larger yield of alcohol than on using malt. The chromatograms illustrated in fig. 2 show the well-known formation of the oligosaccharides with a 1,6-glucoside link, isomaltose and panose, which developed through transglucoside activity. It is evident that these oligosaccharides were hydrolysed in the course of fermentation. The presence of maltotriose can be explained as in the case of malt-sweetened mashess.

Apart from the known sugars which develop on the hydrolysis of starch through the enzymatic action of fungus preparations, still further sugars developed during

Table 4. Analysis of Sweet Mash Saccharified with a Mixture of Preparations of *A. oryzae* and *A. niger* and Course of Fermentation. Tun No. 3

Time of fermentation	Hours			
	0	24	48	72
Saccharification (° S)	16.4	4.4	1.7	1.7
Temperature (° C)	25	32	28	22
Titrateable acidity	0.50	0.70	0.80	0.92
pH	5.0	4.5	4.2	4.1
Reducing substances (%)	7.33	0.56	0.34	0.29

Table 5. Analysis of Sweet Mash Saccharified with a Mixture of Preparations of *A. oryzae* and *A. niger* and Course of Fermentation. Tun No. 4

Time of fermentation	Hours			
	0	14	38	72
Saccharification (° S)	15.30	4.40	2.00	1.95
Temperature (° C)	25	28	27	20
Titrateable acidity	0.60	0.70	0.75	0.88
pH	4.5	4.3	4.1	4.0
Reducing substances (%)	7.07	0.55	0.35	0.43

Table 6. Analysis of Sweet Mash Saccharified with a Preparation of *A. niger* and Course of Fermentation. Tun No. 5

Time of fermentation	Hours			
	0	24	48	72
Saccharification (° S)	15.6	6.3	2.3	1.75
Temperature (° C)	22	26	26	23
Titrateable acidity	0.50	0.58	0.62	0.79
pH	5.1	4.6	4.5	4.2
Reducing substances (%)	6.83	1.25	0.34	0.28

Table 7. Analysis of Sweet Mash Saccharified with a Preparation of *A. niger* and Course of Fermentation. Tun No. 6

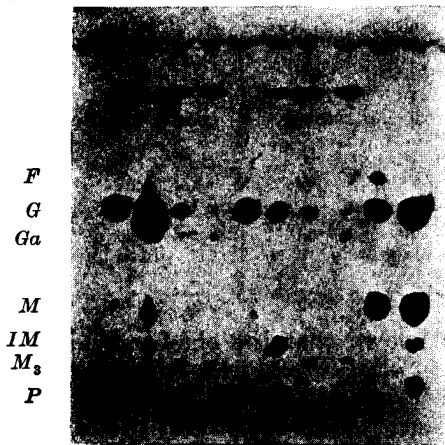
Time of fermentation	Hours			
	0	34	28	72
Saccharification (° S)	16.20	7.30	2.10	1.65
Temperature (° C)	22	27	26	22
Titrateable acidity	0.60	0.66	0.71	0.74
pH	6.0	4.6	4.4	4.2
Reducing substances (%)	5.01	1.13	0.37	0.43

fermentation through the action of these preparations. The spots at the head of the chromatogram are probably pentose and galacturonic acid. An interesting finding is the appearance of galactose after the first day of fermentation, which in this case is not fermented.

*Saccharification of potato mashes with a preparation of A. niger:* The preparation of *A. niger* was added to the mash in two instalments, the first part being added at the commencement of extraction into the condensation water and the second part when extraction had been completed. During extraction a temperature of 60° C was maintained in the mashing tun. When extraction was complete, the temperature was raised to 65° C and the pH to 5.0 and the mash was saccharified at this temperature for one hour. When tested with iodine solution, the mash had a pale pink coloration.

In mash No. 5, the amount of the preparation equalled 14.3% of the weight of the starch and saccharification of the mash amounted to 15.6° S and in vat No. 6, 11.7% and 16.2° S respectively. Liquefaction of both mashes was normal. The results of these experiments are given in tabs. 6, 7, 8 and 9 and in fig. 3.

The values given in the tables show that hydrolysis of the starch and dextrans was complete. This is also confirmed by the chromatograms (fig. 3), in which a very small amount of galactose is also seen to have developed. Microscopically it was found that fermentation was not contaminated and no foreign micro-organisms were



Hrs 0 24 48 72 0 14 38 72  $S_2$   $S_1$   
Tun 5 Tun 6

Fig. 3. Chromatographic Study of Fermentation of Mashs Saccharified with a Preparation of *A. niger*. F: fructose, G: glucose, Ga: galactose, M: maltose, IM: isomaltose,  $M_3$ : maltotriose, P: panose,  $S_1$ : maltose incubated with a preparation of *A. niger*,  $S_2$ : wort.

found. The Ellrodt test, carried out in the matured mash, showed that a large excess of the active enzymatic system which breaks down the starch was still present. These circumstances were favourably manifested in the amount of alcohol obtained, which was greater than on using a mixture of both fungous preparations.

*Quality of the alcohol:* Tab. 10 gives the analyses of the alcohol yield.

It is evident from the individual determinations that the crude alcohol obtained from mashs saccharified with fungous preparations has almost the same composition as the crude alcohol obtained from mashs saccharified with malt. The flavour of the alcohol obtained by means of fungous preparations, however, was better.

#### Discussion

One of the technological problems in the saccharification of starchy raw materials, and of potato mash in particular, is rapid liquefaction of the mash during extraction

Table 8. Titration of Residues

	Malt		<i>A. niger</i> + <i>A. oryzae</i>		<i>A. niger</i>	
	Tun 1	Tun 2	Tun 3	Tun 4	Tun 5	Tun 6
Titrateable acidity	0.5	0.48	0.75	0.6	0.55	0.50
Saccharification	4.2	4.3	3.9	3.5	3.3	3.5
Alcohol %	0.08	0.07	0.03	0.05	0.07	0.08
Alcohol % after re-fermentation	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00
Alcohol % after hydrolysis	0.17	0.19	0.10	0.10	0.07	0.09

Table 9. Amount of Alcohol Produced

	Malt		<i>A. niger</i> + <i>A. oryzae</i>		<i>A. niger</i>	
	Tun 1	Tun 2	Tun 3	Tun 4	Tun 5	Tun 6
Litres absolute alcohol	13.99	14.42	15.73	15.03	16.67	16.66

Table 10. Analysis of Crude Alcohol

	Malt		<i>A. niger</i> + <i>A. oryzae</i>		<i>A. niger</i>
	Tun 1	Tun 2	Tun 3	Tun 4	Tun 6
Alcohol % vol.	56.52	64.34	65.92	48.06	64.46
Aldehydes as mg. acetaldehyde per l. absol. alcohol	265	241	380	480	387
Mg. fusel oil per l. absolute alcohol	1190	1160	1910	1350	1363
Furfural	reaction	reaction	reaction strongly positive		positive reaction
Free acids as acetic acid, mg. per l. absol. alcohol	85.0	93.0	72.9	100	93
Esters as ethyl acetate, mg. per l. absol. alcohol	1340	1108	2400	1560	973
Methanol	sequences		reaction in traces		ditto

and in the first phases of saccharification. It is known that the chief enzymatic system which breaks down starch in a preparation of *A. oryzae* is  $\alpha$ -amylase. The initial activity of  $\alpha$ -amylase consists in very rapid liquefaction of the starch, caused by hydrolysis of the 1.4-glucoside links, which are situated more towards the centre of the chain of the starch molecule. Hollenbeck and Blish (1941) established that in the complete liquefaction of starch, only 0.5% of the total glucoside links is broken down. Subsequent dextrination and saccharification by  $\alpha$ -amylase is slower. Fungous  $\alpha$ -amylase has similar properties to those of the  $\alpha$ -amylase of other preparations and only a small amount of this enzyme is required to obtain complete liquefaction of cereal mashes. One of the characteristics of the activity of this enzyme is the quantity of individual fermentable sugars and other fragments of starch that are formed, including a small amount of glucose, a larger amount of maltose and a considerable amount of maltotriose, maltotetraose and the higher dextrans, as already described earlier in connection with chromatographic studies (Burger and Beran 1956b, Stárka 1954, 1955). One of the characteristic enzyme systems of *A. niger* is maltase. In the absence of  $\alpha$ -amylase, it also breaks down the starch molecule, but by an entirely different mechanism, by breaking down glucose from the ends of the chain of the starch molecule (Burger and Beran 1956a). In this case, therefore, liquefaction is more difficult and it is more important to maintain the optimal conditions for the activity of maltase (Beran and Burger 1956). In our experiments this is also evident from the coloration of the mash with iodine solution. When using a preparation of *A. niger*, the achromic point is reached later and less completely than on using a mixture of preparations of *A. niger* and *A. oryzae*. The manner in which the starch is broken down by a preparation of *A. niger* is also evident from the distribution of the sugars on the chromatograms; a considerable amount of glucose, a small amount of maltose and a very small amount of maltotriose and the higher oligosaccharides develop, without counting the oligosaccharides with a 1.6-glucoside link. Our results demonstrate that in the saccharification of concentrated potato mashes, adequate liquefaction can be obtained by means of a preparation of *A. niger* if sufficient active maltose is present (the glucogenic system) and if the optimal conditions for its activity are maintained.

The probably small maltase activity of preparations of *A. niger*, which is deficient in  $\alpha$ -amylase, and the present lack of knowledge, of the optimal conditions for hydrolysis of starch by maltase, by *A. niger* or by both, has led some authors to conclude that a preparation of *A. niger* alone cannot be used for the saccharification

of potato mashes and that it is essential to add malt, chiefly for the sake of good liquefaction (Malcher 1954).

In order to obtain the maximal yield of alcohol it is important that the dextrans which develop during the saccharification process should be completely broken down into fermentable sugars. An important part in this is played by the breaking down of the  $\alpha$ -1.6-glucoside links, which appear in the limit dextrans (Redfern 1950). The enzymes which break down these anomalous links have been found in various amylolytic preparations and also in malt and in fungi. In malt they are very variable (Myrbäck and Ahlborg 1942). It was already demonstrated earlier that a preparation of *A. niger* not only forms non-fermentable oligosaccharides with an  $\alpha$ -1.6-glucoside link, but that it also intensively breaks down these links (Burger and Beran 1954). The higher yields of alcohol obtained by various authors and also in the present work by means of fungous preparations, as compared with malt, can also be explained by the greater variety and, in some cases, by the quantity of the enzymatic systems present in fungous preparations, which break down carbohydrates other than starch. In the fungus *A. niger*, it is known that very active cellulases and  $\beta$ -glucosidases are present (Burger and Beran 1956b), together with polygalacturosidases and galacturosidases. As is seen from the chromatogram (fig. 2), the preparation of *A. oryzae* which was used is strongly characterised by active galactosidase. These forms of enzymatic activity may also be manifested favourably in the yield of alcohol and, as is evident in the case of galactose, the yields can be influenced further by a suitable strain of yeast. It is interesting that preparations of *A. oryzae* are characterised by only slight  $\alpha$ -glucosidase activity, but by considerable galactosidase activity.

In carrying out these semi-pilot plant experiments, no study was made of maximal yields, but a comparison was made, under the same conditions, of the use of fungous preparations and malt for the saccharification of potato mashes. The yield is understandably affected by the losses entailed in the semi-pilot plant method; with the apparatus used they were higher than they would be under industrial conditions and were not corrected to the amount of the samples taken. The latter comprised about 3% of the volume of the mash. As may be seen from the chromatograms (figs. 1, 2 and 3), the yield can be increased still further by using a more suitable strain of yeast, in particular fermenting maltotriose.

From the technological aspect, the use of a preparation of *A. niger* has further advantages, which are displayed in a higher yield of alcohol. The relatively high temperature used during saccharification (65° C) and the possibility of using a lower pH (4.5—5.0) provide favourable conditions for the preparation of a microbiologically non-contaminated mash. A pH of about 4.5 also has a favourable effect during fermentation. At the same time, the hydrolytic activity of the preparation is not affected adversely in any way. The Ellrodt test shows that a considerable amount of effective "diastase" is still present in the mature mash.

The more rapid course of fermentation is not without interest from the aspect of the technology. The quality of the crude alcohol on using fungous preparations for the saccharification of potato mashes is approximately the same as on using malt. In view, however, of the fact that the crude alcohol obtained by means of fungous preparations has a better flavour, it is possible that the composition of the distillate is different from that obtained on using malt.

### Summary

Semi-pilot plant experiments were carried out with the saccharification of potato mashes by means of fungous preparations, under conditions which had previously been studied by laboratory methods. It was found that:

1. Saccharification of potato mashes by means of a combination of preparations of *A. niger* and *A. oryzae* and by a preparation of *A. niger* alone, takes place without any technological difficulties and it is not necessary to add malt when preparing the mash.
2. Mashes saccharified by a combination of preparations of *A. niger* and *A. oryzae* are more fluid than mashes saccharified with malt. When *A. niger* alone is used, liquefaction is normal.
3. The yield of alcohol from mashes saccharified with fungous preparations is greater than from mashes saccharified with malt and is increased still further by using a suitable strain of yeast.
4. When using a preparation of *A. niger*, the higher saccharification temperature (65° C) and the lower pH (4.5—5.0) prevent the development of infection, both during saccharification and also, as regards the pH, during fermentation.
5. Fermentation of mashes prepared with fungous preparations is more rapid.
6. The quality of the crude alcohol is the same, whether fungi or malt are used.
7. As a result of the saccharification activity of preparations of *A. oryzae*, galactose is released during fermentation.

#### References

- Adams, S. L., Balankura, B., Andreasen, W. H.: Submerged Culture of Fungal Amylase. Ind. Eng. Chem. 39 : 1615, 1947.
- Beran, K., Burger, M.: Studium optimálních podmínek pro zeukřování bramborových zápar plísnovými enzymatickými preparáty. Čs. mikrobiol. 1 : 97, 1956.
- Study of Optimal Conditions for the Saccharification of Potato Mashes by Mould Enzyme Preparations. Fol. biol. (Praha) 5 : 329, 1956.
- Burger, M., Beran, K.: K otázce mechanismu hydrolysy dextrinů plísnovými enzymatickými preparáty. Chem. listy 48 : 1395, 1954.
- Burger, M., Beran, K.: O mechanismu účinku maltázy plísně *Aspergillus niger*. I. Vliv teploty na aktivaci hydrolysy škrobu plísnovými preparáty. Chem. listy 50 : 133, 1956a.
- Burger, M., Beran, K.: O transglukosidační činnosti enzymatického preparátu plísně *Aspergillus niger*. Čs. mikrobiol. 1 : 26, 1956b.
- Green, S. R., Stone, I.: Fermentability of Wort Trisaccharide, a Factor in Variable Attenuations. Wallerstein Lab. Comm. 15, 51 : 347, 1952.
- Hollenbeck, C. M., Blish, M. J.: Parallelism Between Starch Dextrinizing and Liquefying Activities of Amylases. Cereal Chem. 18 : 754, 1941.
- Lu Cheng Hao, Fulmer, E. I., Underkofler, L. A.: Fungal Amylase as Saccharifying Agents in the Alcoholic Fermentation of Corn. Ind. Eng. Chem. 35 : 814, 1943.
- Lu Cheng Hao, Jump, J. A.: Microbial Amylase Preparations Conversion Agents for Alcoholic Fermentation. Ind. Eng. Chem. 37 : 521, 1945.
- Malcher, J.: Sdělení na konferenci technické mikrobiologie. Praha 1954.
- Le Mense, E. H., Johns, V. E., Corman, J., Blom, R. H., Van Lanen, J. M., Langlykke, A. F.: Grain Alcohol Fermentations Submerged Mold Amylase as a Saccharifying Agent. Ind. Eng. Chem. 41 : 100, 1949.
- Myrbäck, K., Ahlborg, K.: Über Grenzextrine und Stärke. XIV. Spezifität der Amylasen und Produkte ihrer Wirkung. Biochem. Z. 311 : 213, 1942.
- Pan, S. C., Andreasen, A. A., Kolachov, P.: Rate of Secondary Fermentation of Corn Mashes Converted by *A. niger*. Ind. Eng. Chem. 42 : 1783, 1950.
- Redfern, S.: Recent Developments in Amylase Chemistry. Wallerstein Lab. Comm. 13, 41 : 89, 1950.
- Roberts, M., Laufer, S., Stewart, F. D., Laletan, L. I.: Saccharification of Wheat by Fungal Amylases for Alcohol Production. Ind. Eng. Chem. 36 : 811, 1944.
- Sova, V.I.: Nábrada obilných lihovarských sladů amylolytickými preparáty plísnovými. Průmysl výživy 1 : 261, 1950.
- Schoorl, N., Regenbogen, A.: Massanalytische Zuckerbestimmung. Z. anal. Chem. 56 : 191, 1917.
- Schwene, L., Fulmer, E. I., Underkofler, L. A.: Saccharification of Starch Grain Mashes for the Alcoholic Fermentation Industry. Ind. Eng. Chem. 32 : 544, 1940.

- Stárka, J.: Hodnocení amylolytických enzymových preparátů papírovou chromatografií. Čs. biologie 3 : 230, 1954.
- Stárka, J.: Dynamika hydrolýsy škrobu amylasami *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae*. Preslia 27 : 155, 1955.
- Teixeira, C., Andreasen, A. A., Kolachov, P.: Ethyl Alcohol from Cassava. Ind. Eng. Chem. 42 : 1781, 1950.
- Underkofler, L. A., Fulmer, E. I., Schwene, L.: Saccharification of Starchy Grain Mash for the Alcoholic Fermentation Industry. Ing. Eng. Chem. 31 : 734, 1939.
- Underkofler, L. A., Swenson, G. M., Goering, K. J.: Saccharification of Grain Mash for Alcoholic Fermentation. Plant Scale Use of Mold Amylase. Ind. Eng. Chem. 38 : 980, 1946.
- Сотниченко, Л. П.: О частичной замене зернового солода плесневыми грибами. Спирт. промышленность 1 : 39, 1955.

## Новые данные по вопросу применения грибковых амилолитических препаратов для осахаривания картофельных заторов

Полупроизводственные опыты с грибковыми препаратами для выработки спирта из картофеля

К. БЕРАН, М. БУРГЕР и С. ЗЕЛЕНКА

### Резюме

Вопрос полной замены солода грибковыми препаратами при производстве спирта из зерна можно, — на основании данных многочисленных работ, — считать решенным. Но при выработке его из картофеля и у нас, и за границей (Malcher 1954, Сотниченко 1955) — с целью получения максимальной продукции спирта и во избежание технологических затруднений, — допускалась только частичная замена солода, в особенности при разжижении заторов. В настоящей статье и в нескольких других своих работах авторы пытаются восполнить этот пробел и полностью заменить солод грибковыми препаратами.

Уже раньше путем лабораторных опытов было установлено (Беран и Бургер 1956), что при гидролизе молекулы крахмала препаратами *A. niger* и *A. oryzae* важным фактором является оптимальная температура. Для 60-минутного осахаривания картофельных заторов препаратом *A. oryzae* оптимальная температура — это 55 °C, а у препарата *A. niger* 65 °C. Особенно важно соблюдение этой температуры у препарата *A. niger*, так как гидролитическая активность этого грибка с повышением температуры усиливается очень значительно, — гораздо значительнее, чем у препарата *A. oryzae* (Бургер, Беран 1956а). Эти препараты отличаются друг от друга и по оптимальному для декстринизации значению pH: для препарата *A. oryzae* было получено значение 6,1, а для *A. niger* 4,5 (Беран, Бургер 1956).

В связи с фазой образования из декстринов сбраживаемых сахаров (окончательное сбраживание) было установлено, что препарат *A. niger* подвергает предельные декстрины более выразительному гидролизу, чем *A. oryzae*. Было отмечено также, что препарат *A. niger*, вызывающий интенсивное образование несбраживаемых олигосахаридов с 1,6-глюкозидической связью (изомальтоза, панноза), при этом также интенсивно расщепляет эти олигосахариды.

Эти наблюдения послужили основанием для полупроизводственных опытов осахаривания картофельных заторов грибковыми препаратами *A. niger* и *A. oryzae*, приготовляемыми путем выращивания грибов на отрубях. Результаты опытов показали, что:

1. Осахаривание картофельных заторов с помощью комбинации препаратов *A. niger* и *A. oryzae*, или же одним только препаратом *A. niger* при вышеописанных оптимальных условиях протекает без технологических осложнений, и для приготовления затора нет необходимости в прибавлении солода.
2. Заторы, осажариваемые с помощью комбинации препаратов *A. niger* и *A. oryzae*, бывают жиже, чем заторы, осажариваемые солодом. При использовании препарата *A. niger* степень густоты затора бывает нормальная.
3. Продукция спирта из заторв, осажариваемых грибковыми препаратами, бывает выше, чем из заторв, осажариваемых солодом.
4. При использовании препарата *A. niger* более высокая температура декстринизации (65 °C) и низкое значение pH (4,5—5,0) препятствуют размножению инфекции, — как при осажаривании, так и при брожении.
5. Сбраживание заторв с грибковыми препаратами протекает быстрее.
6. При использовании грибов качество получаемого сырого спирта бывает такое же, как и при применении солода.
7. В результате декстринизирующей активности препарата *A. oryzae* при сбраживании освобождается галактоза (рис. 2).

## FOLIA BIOLOGICA

Том. III. (1957) — Fasc. 2.

### Гигантские клетки дрожжей

О. НЕЧАС

Институт общей биологии медицинского факультета университета в Брно

Поступило в редакцию 19 X 1956

В своей работе мы не будем касаться гигантских клеток дрожжей, возникающих под влиянием различных внешних физических и химических факторов; мы ограничимся цитологическим разбором и попыткой объяснить механизм возникновения гигантских клеток, которые появляются в культурах самопроизвольно, при обычных условиях культивации.

#### Методика

Все наблюдения мы производили над чистой культурой промышленных дрожжей. Мы культивировали дрожжи (поскольку не указывается иначе) на сусле с 10—13° Balling-a и на пластинках агара с тем же сусликом при pH 5,4—6,0. Чтобы сделать возможным исследование возникновения и дальнейшего развития гигантских форм с помощью пайтраффера, большая часть культиваций производилась на агаровых пленках во влажной камере. Для определения гликогена, волютин и жира мы пользовались иодом, метиленовой синькой и суданским оранжевым. Реакцию Фельгена мы производили на мазках, в следующей модификации: фиксация с помощью фиксажа Carnoy, гидролиз в течение 7 мин. в n/1 HCl при 60 °C, реагент Шиффа в течение 2 час., трехкратное промывание в сернистой воде.

#### Результаты

**Морфологические особенности.** При небольшом увеличении гигантские клетки дрожжей на препаратах бросаются в глаза своими размерами, структурой плазмы и сравнительно большим индексом преломления (рис. 1, 2), а также тем, что они бывают соединены по две, как диплококки. Молодые гигантские клетки бывают яйцеобразные, позднее они большей частью меняются в шары (рис. 3). Средние размеры гигантских клеток бывают 11—14  $\mu$ , однако часто встречаются и более крупные клетки, достигающие 20  $\mu$  в диаметре (рис. 3). Возникновение подобных гигантских двойных клеток наблюдали Holweck и Laccasagne (1930), Wusckoff и Luyet (1931) и Euler (1942 a) в культурах дрожжей под действием лучей X.

По структуре плазмы гигантские клетки (ГК) резко отличаются от нормальных дрожжей: они никогда не содержат вакуолей, и плазма у них сильно зернистая. Содержание гликогена и волютин в ГК не бывает повышено и подвергается значительным колебаниям, как и в нормальных клетках той же культуры, однако количество жира в ГК гораздо больше, чем в нормальных клетках. Жир в форме мелких капелек равномерно рассеян в плазме всей клетки. Это повышенное содержание жира и является причиной повышения индекса преломления у ГК.

**Встречаемость и условия возникновения.** ГК возникают только в аэробных условиях, т. е. в культурах на агаре или капельных. В анаэробных условиях,

т. е. при сбраживании в пробирках, тоже возникают крупные клетки, но совершенно другого характера: это, повидимому, полиплоидные дрожжи, возникновение которых в бродящих культурах отметили Subramaniam (1948) и другие.

Больше всего ГК встречается в фазе логарифмического роста, — в течение 12—24 часов. Позднее их количество относительно уменьшается, так как нормальные клетки размножаются очень быстро. Но ГК возникают только тогда, если на питательную среду перенести анаэробную (бродившую в пробирке), культуру, достигшую стационарной фазы развития. Если же пересеять на свежую питательную среду, напр., 24-часовую культуру, то возникновение гигантских форм не наблюдается. Равным образом, ГК возникают только из тех клеток, которые были перенесены в фазе покоя, а не из клеток, возникающих в культуре в течение инкубации. Это означает, что ГК возникают только из старых клеток. Поэтому то максимальный процент ГК встречается в начале фазы роста, когда количество старых клеток бывает относительно наиболее велико. Культура дрожжей содержит клетки различного возраста. Если не принимать во внимание клетки, которые были посеяны, то наиболее старыми в наших культурах в стационарной фазе являются приблизительно 3-дневные клетки. Так можно приблизительно определить и минимальный возраст дрожжей которые образуют ГК.

*Развитие гигантских клеток.* На основе непрерывных наблюдений ГК на пленках агара во влажных камерах мы нашли следующий процесс развития ГК: у дрожжевой клетки нормальных размеров начинается почкование при одновременном сильном увеличении размеров. С ростом материнской клетки меняется и ее структура. В течение дальнейшего развития и дочерняя клетка дорастает до размеров материнской, не отделяясь от нее. Так возникают характерные двойные клетки. Растут они очень медленно и этого состояния достигают в среднем через 12 часов. Дальнейшее развитие двойных клеток бывает различно: некоторые из них погибают, не меняясь уже дальше; часто оболочка разрывается и содержимое изливается в среду. Другие двойные клетки продолжают расти и достигают и 20  $\mu$  в диаметре, не порождая новых клеток. Однако около половины гигантских двойных клеток оказываются способными к новому почкованию, но генерационный период у них длится гораздо больше, чем у нормальных клеток. В течение первых нескольких генераций возникают опять-таки ГК, но в течение дальнейших генераций размеры клеток уменьшаются, их структура приближается постепенно к структуре нормальных клеток. В конце концов во всех наблюдавшихся нами случаях возникали с виду совершенно нормальные клетки (рис. 4, 5). Такой же постепенный переход к нормальным клеткам отметили Levan и Sandwall (1943) у самопроизвольно возникающих ГК и Euler (1942) — у ГК, возникших под действием лучей X. Исследуя процесс почкования ГК, мы часто наблюдали атипичное почкование (рис. 7).

*Ядерные условия.* Препараты, окрашенные по Фельгену, доказывают, что причиной гигантизма является, собственно, нарушение ядерного деления: только одна из пары гигантских клеток содержит ядро (рис. 8, 9, 10, 11), размеры которого отвечают размерам ядер нормальных клеток дрожжей, что важно для решения вопроса о полиплоидии. Ядра ГК окрашиваются большей частью менее интенсивно, чем нормальные ядра. Ядро не имеет в двойной клетке постоянного места, однако чаще всего оно бывает расположено вблизи соустия между обеими клетками. При почковании гигантских двойных клеток можно найти ядро уже в каждой клетке (рис. 12, 13). В совсем не способных к почкованию двойных клетках всегда бывает ядро только в одной из них.

### *Дискуссия*

На основе установленных нами фактов можно следующим образом объяснить механизм возникновения ГК: в нормальной клетке начинается почкование, т. е. деление ядра и деление клетки, но потом по причинам, выяснить которые нам не удалось, деление ядра прерывается в фазе перед удвоением числа хромосом. Возникает реституционное ядро, — диплоидное и поэтому по своим размерам не превышающее размеры ядер нормальных диплоидных дрожжей. Однако начавшееся почкование клетки продолжается. В результате ядерных нарушений нарушается и координация процессов обмена в клетке, наблюдается непомерный рост клетки и накопление липоидов. В некоторых клетках ядерные нарушения оказываются необратимыми, клетки способны только к известному росту, но не к делению. Это — те клетки, которые дорастают и до  $20\ \mu$  в диаметре и никогда не размножаются. Однако в некоторых случаях через известное время (через 12—24 часа) нарушенные ядерные отношения восстанавливаются, ядро делится, дочернее ядро перемещается в образовавшуюся уже дочернюю клетку, и потом в обеих одновременно начинается почкование. В течение следующих генераций постепенно приходит в норму и нарушенный метаболизм клетки, размеры клеток уменьшаются, меняется структура плазмы и в результате возникают опять нормальные клетки. Вся эта вторая фаза — это, собственно, «излечение» ядерных нарушений.

В литературе предмета мы находим много подтверждений этого нашего взгляда. Holweck и Laccasagne (1930) при своих опытах облучения дрожжей различными дозами лучей X пришли к таким же результатам. Значительные дозы облучения немедленно убивают дрожжи. При средних дозах наблюдается прекращение митоза, дочерняя клетка удваивает свои размеры, но больше не делится. При небольших же дозах облучения возникают морфологические отклонения, на основе которых удалось вырастить устойчивые расы. Наши наблюдения можно сравнить с результатами действия средних доз облучения. Wusckoff и Luyet (1931) подобным образом объясняют возникновение двуклеточных колоний; Euler (1942б) описал постепенный переход ГК, полученных путем облучения, в нормальные клетки. Итак, изучаемые нами ядерные нарушения с последующим гигантизмом дрожжей можно сравнить с нарушениями, вызываемыми средними дозами лучей X.

С другой стороны, самопроизвольно возникающие ГК нельзя сравнивать с ГК, которые получаются под влиянием сильно действующих веществ, в особенности камфоры и канцерогенов: такие гигантские клетки (Nadson 1935, Dodge и Dodge 1937, Bauch 1941а, б, 1942а, б, 1953, Thaysen и Morris 1943, Мейсель 1944, Thomas 1945, Subramaniam и Ranganathan 1946, Luteraan и Dieng 1948) остаются неизменными в течение ряда генераций, и это считается случаями мутации, а у некоторых штаммов — полиплоидией. Цитологическое доказательство наличия у них полиплоидии дал Levan (1946, 1947). Он нашел, что в стадии покоя ядра этих дрожжевых клеток бывают крупнее нормальных, а при митозе наблюдал увеличение количества хромосом. Итак, это не то цитологическое изменение, которое описано в нашей работе.

Другие доказательства того, что у описываемых нами ГК речь идет не о полиплоидии, вытекают из кариометрических измерений Mundkur-a (1953, 1954) и из морфологического описания тетраплоидных дрожжей у Townsend-a и Lindgren-a (1954). Если предположить, что размеры клеток пропорциональны степени полиплоидии, то и переход к нормальным диплоидным клеткам должен был бы осуществляться внезапно или скачками. Но, по нашим наблюдениям,

гигантские клетки превращаются в клетки нормальных размеров — за некоторыми исключениями — постепенно.

Subramaniam и его школа доказывают возникновение эндополиплоидных клеток в анаэробных, т. е. бродящих культурах (Subramaniam 1948, Duraiswami и Subramaniam 1950, Prahlada Rao и Subramaniam 1953, Thiagarajan и Subramaniam 1954). Интересно, что эти эндополиплоидные клетки возникают также при перенесении культуры в покое в свежую питательную среду, что отвечает нашим наблюдениям. Разница только в том, что ГК, описываемые нами, возникают именно в небродящей, т. е. аэробной, культуре.

Подводя итоги, можно сказать, что сущностью самопроизвольного возникновения гигантских клеток в аэробных культурах дрожжей является не эндополиплоидия, а полная или временная остановка начавшегося митоза в стадии перед удвоением числа хромосом при последующем образовании реституционного ядра. В некоторых же случаях осуществляется потом новое, уже нормальное, деление ядра, и гигантские клетки превращаются постепенно в нормальные.

Из наших опытов можно сделать общий вывод, что увеличение клетки следует считать полиплоидией только в том случае, если ее наличие было доказано путем цитологического разбора.

#### *Резюме*

1. После посева культуры в покое в свежую питательную среду при аэробных условиях возникают гигантские клетки, диаметр которых доходит до 20  $\mu$ .

2. Гигантские клетки бывают без вакуолей, с зернистой плазмой, и содержат значительные количества липоидов. Они образуют характерные двойные клетки. Только одна из этих клеток содержит ядро, которое бывает таких же размеров, как и ядро нормальных диплоидных клеток дрожжей.

3. Часть гигантских клеток не способна к почкованию. Отпочковавшиеся же клетки в течение нескольких генераций всегда превращаются в нормальные клетки дрожжей.

4. Автор отвергает возможность полиплоидии как причины возникновения гигантских клеток и полагает, что дело идет об устойчивом или же временном прекращении начавшегося митоза в стадии перед удвоением числа хромосом. Причиной увеличения размеров клеток являются сопровождающие нарушения метаболизма.

(Табл. XIII, XIV)

#### *Л и т е р а т у р а*

- Мейсель, М. Н.: Действие опухолеобразующих веществ на микробную клетку. ДАН СССР 42 : 399, 1944.
- Bauch, R.: Experimentelle Mutationsauslösung bei Hefen und anderen Pilzen durch Behandlung mit Campher, Acetnaphthen und Colchicin. Naturwissenschaft 29 : 503, 687, 1941a.
- Bauch, R.: Experimentelle Mutationsauslösung bei der Hefe durch chemische Stoffe. Wochenschr. Brauerei 99 : 19, 1941b.
- Bauch, R.: Über Beziehungen zwischen polyploidisierenden, carcinogenen und phytohormonalen Substanzen. Auslösung von Gigasmutationen der Hefe durch pflanzliche Wachstumsstoffe. Naturwissenschaft 30 : 420, 1942a.
- Bauch, R.: Experimentelle Auslösung von Gigasmutationen bei der Hefe durch carcinogenen Kohlenwasserstoffe. Naturwissenschaft 30 : 263, 1942b.
- Bauch, R.: Die Konstanz der chemisch induzierten Gigas-Rassen der Hefe. Wissenschaftl. Zschr. Univ. Greifswald 3 : 123, 1953/4.
- Dodge, C. W., Dodge, B. S.: Some Effects of Methyl-cholanthren on the Morphology and Growth in Yeasts. Ann. Missouri Bot. Garden 24 : 583, 1937.

- Duraiswami, S., Subramaniam, M. K.: Reversal of Some Chromosomal Mutations in Yeasts. *Cellule* 53 : 213, 1950.
- Euler, V. H.: Einwirkung von Röntgenstrahlen auf Hefen und Hefenbestandteile. *Arkiv Kemi. Mineral. Geol.* 16 : 14, 1942a.
- Euler, V. H.: Veränderungen der Hefezellen durch Röntgenstrahlen und durch chemische Substanzen. *Z. Physiol. Chem.* 277 : 18, 1942b.
- Holweck, F., Laccasagne, A.: Action sur les levures des rayons X mous (K du fer). *C. R. Soc. biol.* 103 : 60, 1930.
- Levan, A.: Mitotic Disturbances Induced in Yeast by Chemicals and their Significance for the Interpretation of the Normal Chromosome Conditions of Yeast. *Nature* 158 : 626, 1946.
- Levan, A.: Studies on the Camphor Reaction of Yeast. *Hereditas* 33 : 457, 1947.
- Levan, A., Sandwall, G. C.: Quantitative Investigation on the Reaction of Yeast to Certain Biologically Active Substances. *Hereditas* 29 : 164, 1943.
- Luteraan, J., Dieng, F.: Mutations provoquées par action directe ou indirecte sur la partie caroténoïde de l'insaponifiables des organismes fongiques. *C. R. Acad. Sci. Paris* 226 : 1032, 1948.
- Mundkur, B. D.: Interphase Nuclei and Cell Size in Polyploid Series of *Saccharomyces*. *Experientia* 9 : 373, 1953.
- Mundkur, B. D.: The Nucleus of *Saccharomyces*: A Cytological Study of a Frozen-dried Polyploid Series. *J. Bact.* 68 : 514, 1954.
- Nadson, G. A.: Sur les variations héréditaires provoquées expérimentalement chez les levures. *C. R. Acad. Sci.* 200 : 1875, 1935.
- Prahlada Rao, L. S. P., Subramaniam, M. K.: Studies on the Cytology of Yeast. VII. Nuclear Phenomena in Cells from 24-hour Agar Slants. *Proc. Ind. Acad. Sci.* 37 : 72, 1953.
- Subramaniam, M. K.: Studies on the Cytology of Yeast. IV. Endopolyploidy in Yeasts. *Proc. Nat. Inst. Sci. of India* 14 : 325, 1948.
- Subramaniam, M. K., Ranganathan, B.: A New Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 157 : 49, 1946.
- Thaysen, A. G., Morris, M.: Preparation of a Giant Strain of *Torulopsis utilis*. *Nature* 152 : 526, 1943.
- Thiagarajan, T. R., Subramaniam, M. K.: Studies on the Cytology of Yeasts. IX. Cytology of Cells from a Two-day Old Giant Colony. *Arch. Microbiol.* 20 : 183, 1954.
- Thomas, P. T.: Experimental Imitation of Tumour Conditions. *Nature* 156 : 738, 1945.
- Townsend, G. F., Lindgren, C. C.: Characteristic Growth Patterns of the Different Members of a Polyploid Series of *Saccharomyces*. *J. Bact.* 67 : 480, 1954.
- Wyckoff, R., Luyet, M.: The Effect of X-rays, Cathode and Ultraviolet Rayons on Yeast. *Radiology* 17 : 1171, 1931.

## Giant Yeast Cells

O. NEČAS

### *Summary*

If a culture of yeast cells in the resting phase is re-inoculated on to malt agar, giant cells develop in the first 12 hours of growth. The present communication deals with the cytological analysis of these giant cells.

In a preparation, the giant yeast cells are conspicuous at first glance, even with small magnification, because of their size, the structure of the plasma and the relatively high refractive index (figs. 1 and 2). They are also conspicuous by being joined in pairs, like diplococci. Young giant cells are ovoid, later becoming for the most part spherical (fig. 3). Their average size is 11–14  $\mu$ . Even larger cells are frequently found, however, with a diameter up to as much as 20  $\mu$  (fig. 3). The structure of the plasma is strikingly different from that of normal yeast cells. The giant cells never contain vacuoles and their plasma is markedly granular.

The glycogen and volutin content of the giant cells is not increased and ranges substantially within the limits of normal cells of the same culture. There is consid-

erably more fat in the giant cells, however, than in normal cells. The fat is deposited in the plasma in the form of minute droplets, evenly distributed throughout the cell. The increased fat content is also the cause of the increased refractive index of the giant cells.

Giant cells develop only under aerobic conditions, i. e. in cultures grown on agar or in hanging-drop cultures. Under anaerobic conditions, i. e. in cultures fermenting in test-tubes, larger cells develop, but these are of an entirely different character. They are evidently polyploid cells, the development of which in fermenting cultures was found by Subramanian (1948) and others.

The largest number of giant cells are found in the lag phase of growth of the culture, i. e. in the first 12—24 hours. Their number then progressively and relatively rapidly decreases as the normal cells rapidly proliferate. Giant cells develop only when the nutrient medium is inoculated with a culture which has reached the stationary phase. From the further facts it follows that the giant cells described by the author develop only from cells older than 48 hours.

On the basis of a large number of continuous observations of cultures on agar films in moist chambers, the author found that the giant cells developed as follows: A yeast cell of normal size begins to bud and at the same time increases considerably in volume. As the mother cell increases in size, its structure changes. In the course of further development, the daughter cell grows to the same size as the mother cell, with which it remains connected. In this way characteristic twin cells develop. Growth is very slow and this stage is usually reached after about 12 hours, when several generations of normal yeast cells have already budded. The further development of these twin cells varies. Some of them perish without changing any further. Some remain unchanged for a number of weeks. About half the giant twin cells, however, are capable of new budding. Their period of generation is considerably longer than that of normal cells. During the first few generations, giant cells are also formed; with further generations, however, the size of the cells decreases, the structure progressively approximates to the structure of normal cells and finally in all cases yeast cells of an entirely normal appearance develop (figs. 4 and 5). When studying the course of budding of the giant cells, atypical budding was frequently found (fig. 7).

The results of a study of preparations stained by the method of Feulgen show that the gigantism is actually due to a disturbance of cell division. Only one of the giant twin cells contains a nucleus (figs. 8, 9, 10, 11). The size of this nucleus corresponds to that of the nuclei of normal cells (this is important in deciding whether or not the cell is a polyploid). The degree of intensity of staining in the nuclei of giant cells is usually lower than in normal cells. In budding giant twin cells a nucleus is found in each cell (figs. 12, 13). In twin cells which are not permanently capable of budding, however, a nucleus is found in only one of the cells.

On the basis of the facts ascertained, the author explains the mechanism of the development of giant cells as follows: A normal cell begins to bud, i. e. the nucleus and cell divide. From a cause which the author was unable to discover division of the nucleus then stops, in the phase prior to doubling of the number of chromosomes. A restitution nucleus develops, which is diploid and therefore the same size as the nuclei of normal diploid yeast cells. Budding of the cell is, however, completed. Disorganisation of the nucleus also results in disorganisation of the coordination of metabolic processes in the cell, which is displayed in disproportionate growth of the cell and accumulation of lipoids. In some cells the disorganisation of the nucleus is irreversible and the cell is capable only of a certain degree of growth, but not of division. Those are the cells which grow to a diameter of 20  $\mu$  and never bud. In some cases, however, after a certain time (12—24 hours), the nuclear disturbance is righted, the nucleus

divides, the daughter nucleus passes into the daughter cell which has already been formed and both cells begin to bud simultaneously. In further generations the metabolic disturbances in the cell are progressively righted, the cells decrease in size, the structure of the plasma changes and normal cells again result. The whole of this second phase is actually of "healing" of the nuclear disturbance.

Further in the discussion the author compares his own results with the work of Holweck and Laccasagne (1930), Wyckoff and Luyet (1931), Euler (1942) and other authors who evoked the development of giant cells by physical and chemical means. It is important to differentiate the giant cells described here from the polyploid cells, described in the communication of Subramanian (1948) and other authors.

### *Conclusion*

1. Following re-inoculation of a stationary culture on to a fresh nutrient medium giant cells develop under aerobic conditions, which may reach a size of up to  $20\mu$ .
2. The giant cells have no vacuoles, the plasma is granular and the cells contain a large amount of lipoids. Characteristic twin cells are formed. Only one of these cells contains a nucleus, which is the same size as the nucleus of normal diploid yeast cells.
3. Some of the giant cells are not capable of budding. Those cells which do bud always develop into normal cells in the course of a few generations.
4. The author excludes the possibility of polypoidia as a cause of the development of giant cells and is of the opinion that they are the result of permanent or temporary disorganisation of mitosis in the stage prior to duplication of the chromosomes, with accompanying metabolic disturbances as the cause of the increase in the size of the cells.

*(Plates XIII, XIV)*

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. (1957) — Fasc. 2.

### The Action of Streptomycin on Chloroplasts of the Flagellate *Euglena gracilis* Klebs

J. VÁVRA

Protozoology Laboratory, Czechoslovak Academy of Science, Praha

Received December 15, 1956

The ability of the green flagellate *Euglena gracilis* to form apochlorotic cells has long been known (Ternetz 1912, Lwoff 1943). Provasoli et al. (1948) and Jírovec (1949) found that streptomycin caused complete and permanent loss of chlorophyll in *E. gracilis*. Strains bleached by streptomycin have been grown in daylight in the above laboratory for nine years without their green coloration returning. The aim of the present work was to ascertain the process by which chlorophyll is lost by the action of streptomycin.

A number of views have been expressed on the mechanism of apochlorosis. Lwoff and Schaeffer (1949) assumed that streptomycin blocks the synthesis of chlorophyll in the plastids and drew attention to the structural similarity of the molecule of chlorophyll and of the streptidine fraction of streptomycin. In a further communication published the same year, these two authors expressed the opinion that the rate of division of the chloroplasts is lower than the rate of division of the cell. This feature had already been observed earlier in *E. mesnilli* grown in the dark (Lwoff and Dusi 1931). Provasoli, Hunter and Pintner (1951) observed loss of plastids of *E. gracilis* in the fluorescent microscope. They record that the action of streptomycin on plastids is similar to transferring them to the dark, but that the changes are irreversible. The plastids decrease in size and number, lose their ability to be stained with iron haematoxylin and display various striations, wrinkles and thickening. In the later stages fragmentation occurs.

It is interesting to note that artificially apochlorotic strains of *E. gracilis* were also obtained by growing these flagellates at raised temperatures (Pringsheim 1951) and by the action of the antihistamine pyribenzamine (Gross 1955).

#### Material and Methods

Loss of plastids was studied in detail in the Mainx strain of *E. gracilis* from the collection of cultures in the Protozoology Laboratory of the Czechoslovak Academy of Science. This strain displays medium sensitivity to the action of streptomycin. On adding 500 units streptomycin/ml. culture medium, a permanently white culture, growing well, is obtained without difficulty. Composition of culture medium: 2 g. Na acetate, 5 g. Bactopeptone Spofa, 0.5 g. yeast extract Difco, 1,000 ml. redistilled water, pH 6.8. The strain was cultured in a lighted thermostat (100 W, distance 50 cm.) at 25° C. For the actual observation of loss of plastids, a number of methods were used: observation in vivo, observation of crushed *Euglenae*, observation of *Euglenae* subjected to the action of chloroform (Ternetz 1912). This latter method did not prove satisfactory; as chloroplasts of *Euglena* contract in varying degrees at different stages of development of the culture, as a result of the action of the chloroform, evidently according to the consistency of the plastid stroma. As ascertained by measuring, this contraction is not in any constant relationship to the size of the living chromatophores. Another method used was observation by a fluorescent microscope and the technique of "observation in blue light", described in a previous communication (Vávra 1956). A number of staining methods were also used. The most satis-

factory was fixation of *Euglenae* with Bouin-Hollande fluid and Champy's solution, after which the specimens were embedded in paraffin, cut into very thin sections and stained with Heidenhain's iron haematoxylin or acid fuchsin, according to the method of Altmann. Studies were made of *Euglenae* in static cultures and also in a continuous culture, with the aim of obtaining material at a particular stage of development. The continuous culture apparatus was constructed in the author's laboratory. The inflow is controlled by an electromagnetic clamp and the time of inflow and the intervening intervals are controlled by a system of time relays which can be adjusted as desired.

### Results

#### A. Observations in Blue Light

In non-influenced cells from cultures grown in the light, the chloroplasts are seen as dark disks with a rounded or slightly lobular outline, according to the phase of development. In *Euglenae* in the stationary phase the plastids are mostly disk-like, not lobular, with a discernible light centre containing pyrenoid. Following inoculation of these *Euglenae* into a fresh medium, disappearance of the light centres is observed in the chloroplasts, which increase in size, become more lobular and divide. In the stationary phase the chloroplasts again acquire their original appearance. In a continuous culture the *Euglenae* have permanently the same appearance as *Euglenae* in a fresh medium.

The picture in a culture to which a sufficient amount of streptomycin has been added is somewhat different. In the initial phases of growth of the culture, chloroplasts of normal form are observed, which divide in just the same way as non-influenced *Euglenae*. After 48 hours' growth of the culture, however, a difference is seen in the size of the chloroplasts in the control culture and the culture containing streptomycin. The chloroplasts of the cells with streptomycin are distinctly smaller. In the course of further development these differences become rapidly intensified, the chloroplasts decrease in size still further, are spherical in shape and are less distinct (tab. 1). These very small chromatophores, however, divide normally. The stroma of the plastids is also subject to degeneration, since minute granules appear at the edges of the small plastid disks and become converted into brown bodies. Chloroplasts reduced in size through the action of streptomycin also accumulate in the area round the nucleus, where they frequently form aggregates so dense that it is impossible to observe them individually. The minute debris of the plastids forming these aggregates disappears, in the further development, among the grains of paramylon in the cell. It seems to us, however, that even in the case of *Euglenae* which have been subjected to the action of streptomycin, the plastids can continue

Table 1. Relative size of chloroplasts in culture without and with streptomycin (length and breadth : 2)

Age of culture in hours	Relative size (controls)	Relative size in culture with STM (500 units/ml.)
Initial	7.9 $\mu$	7.9 $\mu$
24	9.5	8.2
48	9.6	7.3
72	8.5	3.9
96	9.4	2.3
120	8.4	1.6 and 0
144	8.2	0, occasionally up to 2.3
168	8.3	0, occasionally up to 2.0
192	8.2	0, occasionally up to 4.0
336	8.0	0, occasionally up to 5.0 - 6.5

to increase in size after growth of the culture has been halted, i. e. in the stationary phase, in the case of those which, for reasons unknown, have undergone only a small number of divisions under the influence of streptomycin. In further division in a fresh medium, however, they rapidly disappear.

#### B. Stained Preparations

In normal, non-influenced *Euglenae* cultured in the light or in the dark, the data of Baker (1933) and Hovasse (1948) were confirmed.

In the presence of streptomycin in the growing culture a similar picture is seen as in the case of *Euglenae* transferred from the light to the dark. The plastids become smaller, irregular in shape, are at first difficult to stain, dark-staining substance forms a number of aggregates at the edge of the plastids, sometimes giving rise to a formation resembling pyrenoid. As the chloroplast becomes progressively smaller, the dark granules occupy an increasingly large proportion, until the entire plastid develops into an irregular aggregate of these granules, which disappear among the similarly staining parts of the hypertrophied chondriome. Fragmentation of the plastids does not, perhaps, occur until these phases are reached. Another picture is seen if a culture in which growth is complete is subjected to the action of streptomycin. In this case streptomycin intensifies the process of aging of the culture and degeneration in the plastids. Dark-staining substance accumulates at the edges of the plastids. In vivo, yellowish granules, gradually becoming brown, are seen to appear in the green colour of the chloroplasts; these increase in size until finally the whole plastid disintegrates. Since the brown bodies do not stain with haematoxylin, this degeneration shows apparently empty spaces in the plastid. Sometimes the dark-staining substance forms several striations on the surface of plastids in process of degeneration. If *Euglenae* with such plastids are transferred to a fresh medium they rapidly disintegrate into aggregates of dark-staining granules, which disappear among the developing chondriome. Unfortunately, the chondriome, which stains in the same way, makes detailed observation impossible, including, in particular, fragmentation of the plastids.

#### C. Fluorescent Microscopy

This method confirmed the results obtained by the "blue light" technique and stained preparations. In *Euglenae* influenced by streptomycin a picture resembling fragmentation of the plastids was often observed, i. e. various protrusions on the plastids or very small chloroplasts among considerably larger chloroplasts. In small chloroplast debris, such dense aggregation of plastids was frequently observed that the whole aggregate had the appearance of a single large chloroplast. In small plastids, a number of shining red points were seen distinctly at their edges, while the rest of the body of the plastid shone only very slightly. This shows that chlorophyll accumulates chiefly at the edge of the plastid in these granules, which are probably identical with the granules of dark-staining substance described in the stained preparations. In the final stages of loss of the plastids, only small, redly glowing points can be seen in the *Euglena* cells, many of which are at the limits of visibility, and are gradually lost in the course of division of the cell.

#### Discussion

In contrast to Lwoff's findings (1949), we found that streptomycin does not block or slow down proliferation of the plastids. The average number of plastids

does not decrease during bleaching, but tends rather to increase (from an average of 20 to 30—45).

The decrease in the size of plastids under the influence of streptomycin is explained by loss of ability of the plastids during division to complete growth. In as far as the chloroplast has not attained a certain minimum size, it can still go on growing in the maximal stationary phase. As soon as this "critical size" is reached during division, however, the chloroplast is so small that it disintegrates and disappears. Only if the doses of streptomycin are small does differentiation into entirely green and entirely white cells take place in the further passages. The proof of this assumption by a series of accurate measurements, however, presents a very difficult problem, which it will be our next task to resolve.

In contrast to the observations of Provasoli (1951) no reduction in the number of plastids was recorded in the course of bleaching. Nor were any grooves or thickening observed in the plastids in the course of loss of chlorophyll, i. e. in the growing culture. These changes can be observed only in cultures in the stationary phase, but they are normal changes of degeneration as found in old cultures. Streptomycin merely accelerates and intensifies them.

In association with loss of plastids in *E. gracilis*, hypertrophy of formations is described which Hollande (1942) and Hovasse (1948) term mitochondria (leucoplasts — Lwoff). We also found hypertrophy in every case.

#### Summary

By means of various methods it was found that plastids of *Euglena gracilis*, when subjected to the action of streptomycin, progressively decrease in size during growth of the culture, lose their subpellicular position, form aggregates round the nucleus until minute formations remain, which disappear in the cytoplasm among mitochondria (leucoplasts — Lwoff) which stain in the same way. Fragmentation of the plastids occurs possibly in the final phase, when the chloroplasts are already greatly reduced in size. Plastid debris is still retained passively for some time during division of the cytoplasm.

The decrease in the size of the plastids under the influence of streptomycin is explained as being due to loss of the ability of the plastids, during division to continue growing. Loss of the plastids is associated with hypertrophy of the formation regarded by Hollande and Hovasse as mitochondria.

(Tables XV, XVI)

#### References

- Baker, C. L.: Studies on the Cytoplasmic Components of *Euglena gracilis* Klebs. Arch. Protistenk. 80 : 434, 1933.  
 Gross, J. A., Jahn, T. L.: Microscopic Observations on *Euglena* During Exposure to Antihistamine. J. Protozool., Suppl. 2 : 71 9, 1955.  
 Hollande, A.: Étude cytologique et biologique de quelques Flagellés libres. Arch. Zool. Exp. Gén. 83 : 1, 1942.  
 Hovasse, R.: Étude cytologique d'Euglènes vertes et incolores, du type *Euglena gracilis*. In Pringsheim 1948.  
 Jirovec, O.: Der Einfluss des Streptomycins und Patulins auf einige Protozoen. Experimentia 5 : 74, 1949.  
 Jirovec, O.: Účinek antibiotik na některé prvoky. Věst. Čs. zool. spol. 13 : 216, 1949.  
 Lwoff, A.: L'évolution physiologique. Étude des pertes de fonctions chez les micro-organismes. Paris 1943.  
 Lwoff, A., Dusi, H.: La suppression expérimentale des chloroplastes chez *Euglena mesnili*. C. R. Biol. 107 : 1068, 1931.  
 Lwoff, A., Schaeffer, P.: Remarques sur une analogie structurale entre streptomycine et chlorophylle. C. R. Acad. Sci. 228 : 511, Paris 1949.

- L w o f f, A., S c h a f f e r, P.: La décolorisation d'Euglena gracilis par la streptomycine. C. R. Acad. Sci. 228 : 779, Paris 1949.
- P r i n g s h e i m, E. G.: The Loss of Chromatophores in Euglena gracilis. New Phytologist 47, (1) : 52, 1948.
- P r i n g s h e i m, E. G.: Experimental Elimination of Chromatophores and Eyespot in Euglena gracilis. New Phytologist 51, (1) : 1951.
- P r o v a s o l i, L., H u n t e r, S. H., S c h a t z, A.: Streptomycin-induced Chlorophyllless Races of Euglena. Proc. Soc. Exp. Biol. 69 : 279, 1948.
- P r o v a s o l i, L., H u n t e r, S. H., P i n t e r, I. J.: Destruction of Chloroplasts by Streptomycin. Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol. 16 : 113, 1951.
- T e r n e t z, C.: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Euglena gracilis Klebs. Jb. wiss. Bot. 51 : 435, 1912.
- V á v r a, J.: Zobrazení chloroplastů v modrém světle. Čs. biologie 5 : 55, 1956.

## Действие стрептомицина на хлоропласты жгутиковых *Euglena gracilis* Klebs

Ю. ВАВРА

### Резюме

Утеря пластидов под действием стрептомицина подробно изучалась нами у *Euglena gracilis* Klebs, штамм Mainx из коллекции культур Протозоологической лаборатории ЧСАН. Этот штамм отличается средней чувствительностью к стрептомицину: при концентрации стрептомицина в 500 ед/мл культивационной среды можно без труда получить хорошо растущие и устойчиво белые культуры. Для наблюдения над утратой пластидов применялось несколько способов: прижизненные наблюдения; исследования действия на пластиды хлороформа, вызывающего сморщивание пластидов; флуоресцентная микроскопия и наблюдения в синем свете (Вавра 1956). Утрата пластидов исследовалась нами также на срезах *Euglena*, зафиксированных жидкостью Bouin-Hollande, Champy и окрашенных железным гематоксилином по Гайденгайну, или же кислым фуксином по Альтманну. Мы наблюдали утрату пластидов как в статических, так и в проточных культурах, которые обеспечивали заранее определенную стадию развития культуры.

Было установлено, что в начальных фазах роста культуры, к которой было прибавлено достаточное количество стрептомицина, хлоропласты жгутиковых, *Euglena* отличаются нормальными формами и делятся так же, как и хлоропласты клеток, не подвергавшихся влиянию стрептомицина. Но уже через 48 часов выращивания заметны первые признаки разницы между опытной и контрольной культурами: хлоропласты в культурах со стрептомицином бывают заметно мельче. В течение культивации эта разница быстро возрастает: хлоропласты все больше мельчают, округляются и скопляются вокруг ядра. Остатки пластидов потом исчезают в клетке среди зерен парамила. Нам кажется однако, что и у *Euglena*, которые подвергались действию стрептомицина, после остановки роста культуры, т. е. в стационарной фазе, пластиды могут дорастать до более крупных размеров, — а именно в тех клетках, которые подвергались лишь незначительному числу делений в стрептомицине. Однако при дальнейших делениях в свежей среде эти пластиды быстро исчезают. На окрашенных препаратах *Euglena*, подвергавшихся действию стрептомицина, наблюдаются изменения, подобные тем, как у *Euglena*, перенесенных со света в темноту: пластиды мельчают, бывают неправильной формы, вначале окрашиваются с трудом;

окрашивающееся темным цветом вещество образует скопления по краям пластидов. Окрашивающаяся темным цветом зернистость занимает все более значительную часть пластида, так что в конце концов весь пластид превращается в скопление зернистости, которое исчезает вместе с окрашивающимися частями гипертрофированного хондриома. Быть может, только в этих стадиях происходит фрагментация пластидов. У *Euglena* в стационарной фазе стрептомицин ускоряет процесс старения культуры и углубляет дегенеративные изменения пластидов: пластиды в более значительной мере превращаются в коричневые тельца («brown-bodies»), на них появляются бороздки, а окрашивающееся темным цветом вещество часто образует несколько полос на поверхности пластидов. В свежей среде такие, уже дегенерированные пластиды быстро распадаются.

В противоположность данным Lwoff-a (1949), мы установили, что стрептомицин не блокирует размножения пластидов и не замедляет его сколько-нибудь заметно. Среднее количество пластидов в течение процесса обесцвечивания не уменьшается, скорее увеличивается. Уменьшение размеров пластидов под влиянием стрептомицина мы объясняем тем, что пластиды в течение деления *утрачивают способность дорастать*. Вопрос, способны ли пластиды, которые не уменьшились до определенных минимальных «критических» размеров, по крайней мере временно, в стационарной фазе, дорастать, будет предметом наших дальнейших работ. С утратой пластидов у *E. gracilis* связана гипертрофия образований, которые Hollande (1942) и Novasse (1948) обозначают как митохондрии. И мы наблюдали во всех случаях эту гипертрофию.

(Табл. XV, XVI)

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. (1957) — Fasc. 2.

### Влияние экологических факторов на специфичность паразитических червей у насекомоядных

Я. ПРОКОПИЧ

Биологический институт ЧСАН, паразитология, Прага

Поступило в редакцию 8 XI 1956

Вопрос специфичности паразитов, ставший в последнее время одним из основных вопросов паразитологии, имеет прежде всего теоретическое значение — при решении проблемы возникновения вида, филогенеза и распространения паразитов среди различных хозяев, как и их систематической принадлежности. Правильное понимание вопроса специфичности паразитов делает далее возможным целый ряд практических мероприятий по борьбе с паразитами, облегчая решение сложных вопросов при переменах жизненных условий хозяев.

Мы даем здесь разбор специфичности 64 видов найденных у нас паразитических червей, опираясь на исследования 600 экземпляров водящихся у нас насекомоядных, принадлежащих к 10 различным видам.

Под специфичностью паразитов мы понимаем исторически сложившуюся и экологически обусловленную приспособленность определенных видов паразитов к определенным видам хозяев, которая создавалась в результате естественного отбора и наследственно закрепилась (Шульман 1954).

Каждый организм требует определенных условий существования, являющихся для него оптимальными, но обладает и способностью существовать при известных отклонениях от этого оптимума. Как показывают паразитические черви насекомоядных, эти отклонения бывают для различных паразитов весьма различны. «Специфичность как определенная норма реакции организма на условия внешней среды», говорит Догель (1947), «стала общераспространенной формой». Ясно, что для паразитических червей насекомоядных, как и для большинства паразитов, средой является в первую очередь хозяин. Между паразитом и хозяином, естественно, создаются определенные отношения. Прежде всего хозяева являются источником пищи для своих паразитов; поэтому паразиты, как и свободно живущие животные, обладают большей или меньшей способностью принимать разную пищу. В зависимости от этого и паразиты, и свободно живущие животные делятся на монофагов и полифагов, т. е. на виды, специфические в большей или меньшей степени. Догель (1947) делит в этом смысле паразитов по степени специфичности на две категории: строго видовую специфичность и относительную специфичность, которая имеет разные пределы.

1. По Догелю строго выраженной видовой специфичностью характеризуются паразиты, приспособленные исключительно к одному виду хозяина, какими в нашем случае являются следующие виды: *Itygonismus talpae*, *Skrjabimerus petrowi*, *Choanotaenia filamentosa*, *Morganiella talpae*, *Capillaria talpae*, которые до сих пор были найдены только у крота обыкновенного; далее виды: *Vampirolepis scutigera*, *Choanotaenia hepatica*, *Longistriata didas*, найденные

пока только у бурозубки обыкновенной. Ленточные глисты *Vampirolepis tri-dortophora*, *V. neomydis* известны только у куторы и т. д.

2. К категории относительно специфических паразитов Догель относит все случаи (несравненно более многочисленные), когда паразит способен использовать больше, чем одного хозяина. Эти случаи являются преобладающими и у паразитических червей насекомоядных. Однако относительная специфичность обладает известными границами: а) некоторые паразиты оказываются специфическими для видов одного рода хозяев, напр., у насекомоядных: сосальщик *Panopistus pricei*, ленточные глисты *Soricinia diaphana*, *Soricinia soricis*, *Neoskrjabinolepis singularis*, *Vigisolepis spinulosa*, *Choanotaenia crassiscolex*, нематода *Longistriata cordus*, которые паразитируют только у видов рода *Sorex*. Ленточные глисты *Staphylocystis jacobsoni* и *Staphylocystis loossi* были пока найдены только у видов из рода *Crocidura*. Паразитические черви *Rodentolepis erinacei*, *Rodentolepis steudeneri*, *Mathevotaenia parva*, *Physaloptera clausa*, *Crenosoma striatum*, *Eucoleus tenuis* и *Nephridiorhynchus major* паразитируют только у видов из рода *Erinaceus* и т. д.; б) менее специфические паразиты могут развиваться у хозяев нескольких родов одного семейства. У насекомоядных такими видами являются: *Staphylocystis alpestris*, *Vampirolepis magnirostellata*, *Insectivorelepis globosa*, *I. globosoides*, *Staphylocystis pistillum*, *Coronacanthus polyacantha*, *Staphylocystis furcata*, *Anomotaenia subterranea*, *Schistometra conoides*, *Panopistus europeus*, *Leucochloridium soricis*, *Synhimanthus rhobaloccephalus*, *Angiostrongylus soricis*, *Heligmonella jugatispiculum*, *Longistriata depressa*, *Capillaria kutori*, *Capillaria petrowi* и *Centrorhynchus buteonis*, которые паразитируют только у родов из семейства *Soricidae*; в) еще менее специфические паразиты встречаются у нескольких семейств одного отряда, напр., виды *Staphylocystis bacillaris*, *Parastrongyloides winchesi*, *Physaloptera kotlani*, *Tricholinstowia linstowi* и *Parrocaecum depressum* паразитируют у семейств *Talpidae* и *Soricidae* из отряда насекомоядных; г) наименее специфические виды паразитируют у весьма отдаленных групп хозяев. У насекомоядных такие случаи паразитических червей встречаются редко, но и здесь можно найти несколько таких примеров, как виды: *Plagiorchis exasperatus*, *Spirura talpae*, *Spirura rytipleurites*, *Polymorphus minutus* и *Prosthorrhynchus formosus*. Нематода *Spirura talpae* паразитирует у кротов, но была найдена также у кошек, лисиц, пасюков, т. е. у систематически очень отдаленных групп. Также нематода *Spirura rytipleurites* водится у ежей, кошек, лисиц, собак, пасюков и крыс. *Polymorphus minutus* паразитирует у рыб, но также у водоплавающих птиц и кутор (рыбы — птицы — и млекопитающие!). Колючкоголовый червь *Prosthorrhynchus formosus* водится у птиц и у ежей. Однако нельзя утверждать, что тот или другой паразит является неспецифическим, т. е. что он вообще не связан с каким-нибудь видом или группой хозяев: я подчеркиваю, что каждый паразит связан с определенным хозяином или группой хозяев, характеризующихся взаимной экологической зависимостью. Это не случайность, что скребень *Prosthorrhynchus formosus* паразитирует у ежей и дятлов, но не встречается у других хозяев. Не случайность и то, что скребень *Polymorphus minutus* водится у рыб, водоплавающих птиц и кутор, объединенных общими источниками пищи, и т. д. Из биологии вышеназванных видов хозяев с первого взгляда очевидно преобладающее значение пищи, обычно общей или весьма схожей у таких групп хозяев.

*Промежуточные хозяева.* Из паразитических червей насекомоядных мы нашли у куторы личиночную стадию ленточного червя *Dilepis undula*, который до сих пор был найден только у беспозвоночных (*Geotrupes* sp.). Подобным образом были найдены личиночные стадии ленточных червей: *Anomotaenia* (?) *leuckarti* у бурозубки обыкновенной и *Schistometra conoides* у серой белозубки (*Crocidura*

suaveolens). У этих двух последних видов до сих пор не были известны промежуточные хозяева среди беспозвоночных. Так как во всех случаях речь идет о ленточных червях птиц, мы судим по аналогии, что у всех этих видов осуществилось приспособление к непривычному хозяину (с беспозвоночных на теплокровных). Grassé (1935) предлагает для паразитов этого характера название «дезертиры» или «перебежчики» и считает это явление позднейшей адаптацией паразитов к новой группе хозяев. В своих работах я присоединяюсь к этому взгляду (1957).

Во многих случаях относительно специфические паразиты у одного из хозяев — главного, основного — находят определенные преимущества в сравнении с другими и встречаются у него чаще. Классическим примером может служить ленточный червь *Coronacanthus polyacantha*, которого мы нашли у 20 кутор из 50 исследовавшихся, но только у 4 бурозубок обыкновенных из 305 исследовавшихся. Я объясняю это тем, что паразит *Coronacanthus polyacantha* экологически связан более тесно с куторой: развитие этого паразита осуществляется в водяных членистоногих, являющихся главной пищей куторы, и в течение исторического развития создалась тесная связь между паразитом и хозяином. 1. Как я имел возможность наблюдать, при определенных конкретных условиях происходят определенные отклонения от нормы, — от связи только с одним хозяином. В области Дуная, где главный хозяин (куторы) не был найден, вид *Coronacanthus polyacantha* встречается у бурозубки обыкновенной. Подобным примером является и нематода *Thominx blarinae*, которая в Америке паразитирует у землеройки *Blarina brevicauda*. У нас этот вид землеройки не водится, однако вид *Thominx blarinae* мы нашли у малой бурозубки (*Sorex minutus*). Здесь сказывается прежде всего географический фактор. 2. На примере находок ленточного червя *Coronacanthus polyacantha* в Челябинской (Бескиды) у обоих видов хозяев проявляются противоположные экологические соотношения, т. е. весьма тесный контакт между обоими видами хозяев (общий биотоп и общий источник пищи — форелья ферма). Аналогичный случай описывает также Эргардова (1955) у сосальщика *Notocotylus noyeri* у полевок в Татрах. Из всего вышесказанного вытекает, что специфичность это понятие относительное, содержание которого обусловлено определенными географическими и экологическими данными и является их непосредственным отражением. Я не согласен с общепринятым обычаем считать главным хозяином тот вид, у которого паразит был найден впервые (отсюда и вытекал ряд видовых наименований паразитов, хотя часто соответственный хозяин как раз и не бывал их главным хозяином!). Некоторые авторы считают паразитов, редко встречающихся у известных хозяев, — в особенности систематически отдаленных, — случайными. Однако не изучив всех условий, очень трудно решить, действительно ли эти паразиты являются случайными, или же в данных конкретных условиях именно эти хозяева являются для них истинными (главными) хозяевами. По моему мнению, кажущаяся случайность является экологической необходимостью и закономерностью (которая в частности представляется случайностью, а при более углубленном изучении выступает как закономерная связь!).

Так как филогенетическое развитие хозяев и паразитов до известной степени стабилизировано наследственностью, оно несет на себе следы филогенетических отношений. Как вытекает из вышесказанного, в некоторых случаях специфичность служит хорошим ориентиром для распознавания степеней филогенетического родства хозяев. Из вышеприведенных примеров очевидно также, что большинство видов червей паразитирует у систематически близких друг к другу единиц хозяев (родов). С увеличением отдаленности систематического родства (семейства, отряды и т. д.) количество общих видов паразитов уменьшается.

Переход паразитов к систематически отдаленным группам хозяев осуществляется по нашему мнению, под влиянием изменений экологических условий у хозяев. Так возникло известное правило Fuhmann-a (1908, 1932), которое в каких-то пределах оставалось в силе по отношению к паразитическим червям птиц. По этому правилу, «каждый отряд птиц характеризуется своей специфической гельминтофауной, представители которой не способны паразитировать у других отрядов птиц». Это правило, которое до известной степени остается в силе, иногда механически распространялось на всех паразитов и приводило к ошибкам, прежде всего в систематике, где отдельные виды паразитов описывались, главным образом, по группам хозяев, не расследовалась их встречаемость у других хозяев и т. п. Возможно, что некоторые из этих паразитов систематически отдаленных хозяев иногда являются или становятся в процессе дальнейшего развития самостоятельными видами.

Против концепции филогенетического детерминизма выступил Догель (1947), который отметил, что состав каждой паразитофауны зависит от ряда факторов. К ним относится, разумеется, и филогенез хозяина, но он не играет решающей роли при возникновении паразитофауны: одним из наиболее важных среди многочисленных факторов здесь является состав пищи. Кроме многочисленных данных мировой литературы, говорящих не в пользу правила Fuhmann-a, а также не в пользу взглядов Eichler-a, несколько подобных примеров приводит Рышавый (1956) для кокцидий. В своих предыдущих работах о паразитических червях насекомоядных я отмечал преобладающее значение состава пищи, которое снова подчеркиваю и здесь. Анализ специфичности паразитических червей у насекомоядных свидетельствует о том, что не существует филогенетического детерминизма: имеется много ступеней специфичности — от нескольких строго специфических видов паразитов вплоть до видов, встречающихся у весьма отдаленных групп хозяев.

#### *Резюме*

В своей работе я даю анализ специфичности 64 видов паразитических червей у насекомоядных. На основании собственных наблюдений я прихожу к заключению, что специфичность паразитических червей у насекомоядных это понятие относительное, остающееся в силе при определенных конкретных экологических условиях. Специфичность паразита снижается с переменами жизненных условий его или его хозяина (или же их обоих), так как они образуют единую систему. Решающее значение я придаю составу пищи хозяина, что я показываю в настоящей статье на примерах нескольких видов паразитов у систематически весьма отдаленных групп хозяев. Но я нисколько не упускаю из виду остальные факторы. При работах по систематике необходимо поэтому учитывать все эти факторы. Иммунологические факторы, значение которых подчеркивает Шульман (1954), я считаю проявлениями вторичной адаптации, подчиняющимися другим закономерностям.

#### *Л и т е р а т у р а*

- Д о г е л ь, В. А.: Курс общей паразитологии. Ленинград 1947.  
 Ш у л ь м а н, С. С.: О специфичности паразитов рыб. Зоол. журн. 33 (1) : 14, 1954.  
 E i c h l e r, W.: Korrelation in der Stammesentwicklung von Wirten und Parasiten. Zschr. Parasitenkunde 12, 1940.  
 E r h a r d o v á, B.: Helminthofauna hrabůš a myši Tatranského národního parku. Zool. listy 4 : 353, 1955.  
 F u h r m a n n, O.: Die Cestoden der Vögel. Zool. Jb. Suppl. 10, 1908.  
 G r a s s é, P.: Parasites et parasitisme. Paris 1935.

- Prokopič, J.: Helminthofauna rejška obecného (*Sorex araneus*) v ČSR. Čs. parazitologie 3 : 109, 1956.
- Prokopič, J.: Výsledky helmintofaunistického výzkumu našich ježků. Věstník čsl. zool. společnosti 21, v tisku, 1957.
- Prokopič, J.: Helminthofaunistický výzkum rejsců z rodu *Neomys*. Věstník čsl. zool. společnosti 21 : 95—115, 1957.
- Prokopič, J.: Systematické zpracování cizopasných červů krtka obecného (*Talpa europaea*) na území ČSR. Zool. listy 6, v tisku, 1957.
- Prokopič, J.: Příspěvek k helmintofauně bělozubek (*Crocivura Insectivora*). Zool. listy 6, v tisku, 1957.
- Ryšavý, B.: Die Frage der Spezifität und Variabilität der Coccidien bei verschiedenen Wirten. Fol. biol. (Praha) 2 : 65, 1956.

## The Influence of Oecological Factors on the Specificity of Parasitic Worms of Insectivora

J. PROKOPIČ

### Summary

On the basis of investigations carried out in 600 specimens of Insectivora from 10 species inhabiting Czechoslovakia, an analysis is made of the specificity of 64 species of parasitic worms found in these animals. The specificity consists in the adaptation of certain species of parasites to certain species of hosts which has developed during their evolution: it is determined oecologically, is influenced by natural selection and strengthened by heredity, as shown by Shulman (1954).

As seen in the parasitic worms of Insectivora, every species requires certain conditions which ensure optimal conditions for life. Every species is naturally able to exist even in the presence of a certain deviation from this optimum, which varies a great deal with different parasites. For parasitic worms of Insectivora, as for most parasites, the environment is in the first place the host. It is therefore natural that a certain relationship exists between parasite and host. The host is primarily a source of nourishment for the parasite: like free living animals, therefore, parasites are also more or less able to take different food. Like free living animals, parasites are also differentiated into monophagous and polyphagous species, i. e. species which are specific to different degrees.

Specificity of parasites may be divided into two categories, according to Dogel (1947): 1. Narrow specificity. This covers parasites which are adapted exclusively to a single host, such as *Ithyogonimus talpae*, *Capillaria talpae*, *Skrjabinomerus petrowi*, *Choanotaenia filamentosa* and *Morganiella talpae*, which have hitherto been found only in the mole. The species *Vampirolepis scutigera*, *Choanotaenia hepatica* and *Longistriata didas* have so far been found only in the common shrew. The tape-worms *Vampirolepis tridentophora* and *V. neomydis* are known so far only from the water shrew.

2. Relative specificity: In accordance with Dogel, it covers cases in which the parasites are capable of existence in more than one host species. Into this category belongs the large majority of parasitic worms of Insectivora. Relative specificity, however, has certain limits: a) Some parasites infest only the species of a single genus, such as the trematode *Panopisthus pricei*, the tape-worms *Soricinia diaphana*, *Soricinia soricis*, *Neoskrjabinolepis singularis* and *Vigisolepis spirulosa* and the nematode *Longistriata didas*, which have so far been found only in the genus *Sorex*. The tape-worms *Staphylocystis jacobsoni* and *Staphylocystis loosi* infest only species

of the genus *Crocidura*, etc. b) Less specific parasites may develop in hosts of a number of different genera of one family: e. g. *Staphylocystis alpestris*, *Vampirolepis magnirostellata*, *Insectivorepis globosa*, *I. globosoides*, *Staphylocystis pistillum* and *Coronacanthus polyacantha*, etc. have been found only in the genera of the family *Soricidae*. c) Parasites which are still less specific infest different families of one order, such as *Staphylocystis bacillaris*, *Parastrongyloides winchesi*, *Physaolptra kotlani*, *Tricholinstowia linstowi* and *Porrocaecum depressum*, which infest the families *Talpidae* and *Soricidae* of the order *Insectivora*. d) The least specific species of parasites, which may be termed non-specific, infest widely differing systematic groups of hosts, without making a deeper analysis. The above data, however, show that as the distance in the systematic position of the hosts increases, the number of species of parasites common to them decreases. In the *Insectivora*, the number of parasites infesting distant systematic groups is very small and reflects the oecological relationships of the hosts. For example, the nematode *Spirura rytypleuritis* infests hedgehogs, cats, foxes, dogs and rats. The acanthocephalon, *Polymorphus minutus* infests fish, water birds and also *Neomys* (fish-birds-mammals). The acanthocephalic worm *Prostorhynchus formosus* infests woodpeckers and hedgehogs (birds-mammals). It should be emphasized that every parasite is bound to a definite host or group of hosts which are oecologically interrelated. Therefore the acanthocephalic worm *Polymorphus minutus* is found only in fresh-water fishes, in water birds, and from mammals in water-shrews. The common feature in this case is the water environment in which the inter-hosts of the acanthocephalon live, many of which are eaten by fish, shrews and water birds. Similar oecological relationships are seen in other cases. The larval stage of the tape-worm *Dilepis undula* was found in *Neomys*, although hitherto it has been described only from *Geotrupes*. The larval stage of the tape-worm *Anomotaenia* (?) *leuckarti* was found in the common shrew and that of *Schistometra conoides* in *Crocidura suaveolens*: these are thought to be cases of late adaptation from invertebrates to vertebrates and are termed "deserters" by Grassé (1935).

In many cases, parasites with relative specificity have a definite preference for a particular host, in comparison to others. For example, the tape-worm *Coronacanthus polyacantha*, although found in the common shrew, occurred in only four out of 305 specimens which were examined. In *Neomys*, on the other hand, it was found in 20 out of 50. Further examples are given in detail in the text.

Since the phylogenetic development of hosts and parasites has to a certain extent become stabilized by heredity, it bears marks of phylogenetic relationships and in some cases, therefore, specificity may be a good guide in determination of the degree of phylogenetic relationship of the hosts. In our view, however, as with Dogell and other authors, phylogenesis does not play the leading role. We are of the opinion that many factors participate, among which oecological factors are of special significance and the most important is the composition of the food. From our own material we have come to the conclusion that specificity of parasitic worms in *Insectivora* is a relative conception, which is valid only under definite oecological conditions. Specificity of a parasite decreases with a change in its living conditions or in those of its host, (or in both), as they form a single system.

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. (1957) — Fasc. 2

### Развитие точки роста проса в связи с его фотопериодической чувствительностью

Ф. САЙДЛОВА и А. МАТИНОВСКАЯ  
Биологический институт ЧСАН, физиология растений, Прага

Поступило в редакцию 27 XII 1956

В своей предшествующей работе (Горжавка, Мартиновская и Стейскал 1956) мы исследовали вопрос продолжительности световой стадии у проса Ганацкая Манна. Одновременно мы испытывали и сравнивали различные методики фотопериодического опыта. Задачей настоящей работы было выяснить отношения между световой стадией, характеризующейся фотопериодической чувствительностью, — и развитием точки роста и образованием соцветия. Эти отношения мы исследовали также при различной продолжительности дня.

#### Методика

Опыты производились в полевых условиях, на опытных делянках Биологического института ЧСАН в Праге. Естественный летний день служил образцом длинного дня. Короткий день мы получали, прикрывая опытные делянки непрозрачными матерчатыми покрывками. В течение опытов мы производили микроморфологический анализ точек роста, оценивая фазу их морфологического развития по шкале. Мы отмечали течение колошения отдельных вариантов. Эти морфологические наблюдения представлены нами графически (рис. 8).

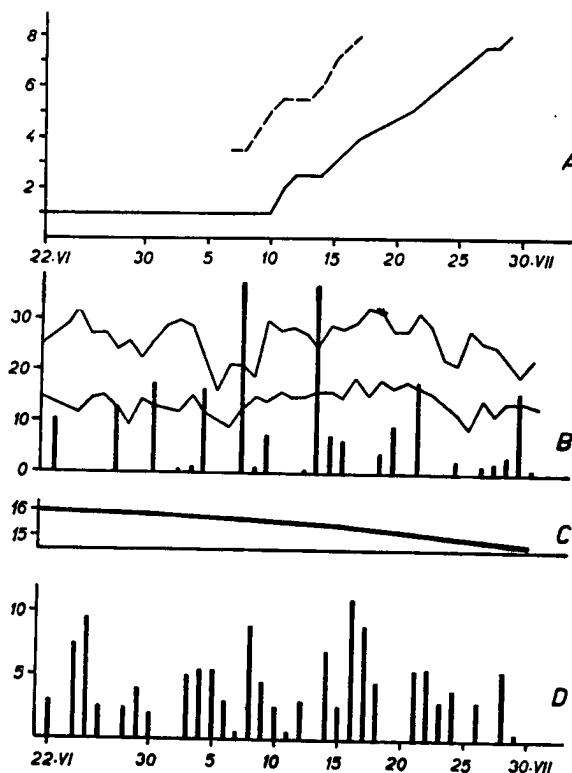


Рис. 8. А — Развитие точки роста при коротком (прерывистая линия) и при длинном дне (сплошная линия). Ось Y — морфологическая фаза развития точки роста по шкале, приведенной на рис. 1—7. В — кривая максимальных и минимальных температур (в °C). Вертикальные линии обозначают осадки (в мм). С — динамика продолжительности дня (в часах). D — солнечный свет в течение опыта (в часах).

Табл. 1. Течение фотопериодической чувствительности при коротком дне

Вариант	Короткий день (в днях со дня всходов)	Дата колошения	Количество дней со дня всходов до колошения	Ускорение колошения в сравнении с контролем при длинном дне
1	2—4	1/VIII	42	0
2	2—6	31/VII	41	1
3	2—8	29/VII	39	3
4	2—10	23/VII	33	9
5	2—12	22/VII	32	10
6	2—14	21/VII	31	11
7	2—16	20/VII	30	12
8	2—18	20/VII	30	12
9	2—20	20/VII	30	12
10	2—22	18/VII	28	14
11	2—24	18/VII	28	14
12	2—26	18/VII	28	14
13	2—28	18/VII	28	14
Kk (контроль) при коротком дне)	2—30	18/VII	28	14
Kd (контроль при длинном дне)	—	1/VIII	42	—

### Результаты

Чтобы выяснить, как точка роста развивается в течение этапа фотопериодической чувствительности при коротком и при длинном дне, мы поставили с сортом Ганацкая Манна классический фотопериодический опыт (т. е. переводили отдельные варианты с короткого дня на длинный), а также дополнительный фотопериодический опыт (т. е. переводили их с долгого дня на короткий). Эти методы подробно описаны в работе Горжавки, Мартиновской и Стейскала (1956). Между отдельными вариантами мы делали двухдневные интервалы. Короткий день был 8-часовой. В качестве длинного дня использовался естественный летний день. Табл. 1 показывает динамику фотопериодической чувствительности при коротком (8-часовом) дне. Приводим только данные о колошении, так как результаты микроморфологического анализа точек роста отвечали течению колошения. Варианты, приведенные в нижней части таблицы, колосились одновременно с контрольными растениями (при коротком дне). Итак, по истечении 20-го дня окончилось время фотопериодической чувствительности при коротком дне. Через неделю после этого у растений, содержащихся при коротком дне, началось колошение. Такие же результаты были получены у этого сорта и в 1954 г.

Развитие точки роста при коротком дне протекало очень быстро (рис. 8). В момент окончания фотопериодической чувствительности, т. е. на 20-ый день после всходов, в точке роста дифференцировалась уже эмбриональная метелка в 3 мм длиной. В верхних цветках, которые у проса бывают наиболее разви-

Табл. 2. Течение фотопериодической чувствительности при длинном дне

Вариант	Короткий день (в днях со дня всходов)	Дата колошения	Количество дней со дня всходов до колошения	Ускорение колошения в сравнении с контролем при длинном дне
1	3—43	20/VII	30	12
2	5—43	20/VII	30	12
3	7—43	20/VII	30	12
4	9—43	22/VII	32	10
5	11—43	24/VII	34	8
6	13—43	24/VII	34	8
7	15—43	25/VII	35	7
8	17—43	25/VII	35	7
9	19—43	27/VII	37	5
10	21—43	30/VII	40	2
11	23—43	1/VIII	42	—
12	25—43	1/VIII	42	—
13	27—43	1/VIII	42	—
14	29—43	1/VIII	42	—
15	31—43	1/VIII	42	—
16	33—43	1/VIII	42	—
17	35—43	1/VIII	42	—
18	37—43	1/VIII	42	—
19	39—43	1/VIII	42	—
20	41—43	1/VIII	42	—
Kd (контроль при длинном дне)	—	1/VIII	42	—
Kk (контроль при коротком дне)	2—43	18/VII	28	14

тыми (Куперман 1950—1951, Ростовцева 1950, 1951), уже формировались бугорки, основания будущих тычинок (рис. 5б, табл. XVII).

На табл. 2 показана динамика фотопериодической чувствительности при естественно длинном дне. Из хода колошения отдельных вариантов видно, что, начиная с 23-го дня после всходов (нижняя часть таблицы) растения уже нечувствительны к продолжительности дня.

При длинном дне развитие точки роста протекало гораздо медленнее, чем при коротком. Дифференциация началась через 21 день после всходов. В момент окончания фотопериодической чувствительности проходила дифференциация только веточек второго порядка а длина всей метелки составляла 0,5 мм. На рис. 9 и 10 показан рост отдельных вариантов при классическом и при дополнительном опыте. Как и в 1954 г., при уборке наблюдалась большая разница в длине растений. Чем больше было коротких дней, тем быстрее протекало развитие и тем меньше были растения. Измерения растений во время фотопериодического опыта показали, что в течение этапа фотопериодической чувствительности или непосредственно после его окончания эта разница еще не заметна. Влияние предшествовавшего вмешательства на рост сказалось только впоследствии, после окончания прикрывания растений, во время и после колошения. Прикрывание влияет на морфогенез точки роста еще во время этапа фотопериодической чувствительности, когда при длинном дне и замедленном

развитии образуется больше оснований листьев, а вместе с тем и больше будущих междоузлий. Но проявиться эта разница может только в период роста междоузлий в длину (стеблевания), который у проса начинается только после прекращения фотопериодической чувствительности. Кроме большего числа листьев и междоузлий, растения, выведенные при длинном дне, отличаются также большей длиной междоузлий.

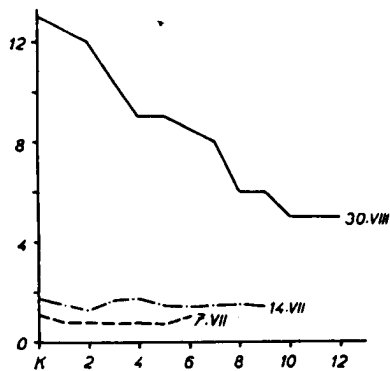


Рис. 9. Высота растений отдельных вариантов при постепенном переходе с короткого дня на долгий. Измерения производились в течение этапа фотопериодической чувствительности (7/VII), непосредственно после прекращения фотопериодической чувствительности (14/VII) и после уборки.

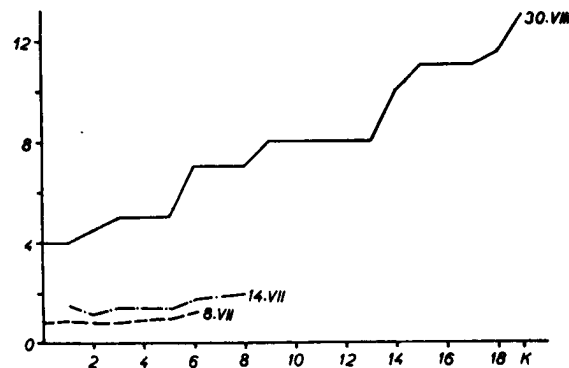


Рис. 10. Высота растений отдельных вариантов при постепенном переходе с длинного дня на короткий. Измерения производились в течение этапа фотопериодической чувствительности (8/VII), перед прекращением фотопериодической чувствительности (14/VII) и после уборки.

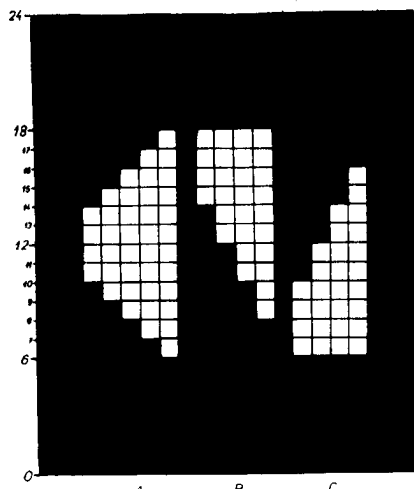


Рис. 11. Схема фотопериодического опыта для определения влияния различной продолжительности дня. А — полуденный фотопериод, В — утренний фотопериод, С — вечерний фотопериод.

Чтобы установить, как протекает развитие при другой длине дня, чем при 8-часовом, мы поставили еще один опыт с двумя сортами: Ганацкой Манной и Саратовским, подвергая их действию 4, 6, 8, 10 и 12-часового дня. Кроме того все растения были разделены еще на 3 группы: группы вариантов с утренним фотопериодом (с 6 часов), полуденным (середина дня в полдень) и вечерним (до 18 часов). Схема опыта дана на рис. 11. Действие определенной продолжительности дня зависело от того, в какое время дня растения выставлялись на свет. Табл. 3 и 4 показывают, что для обоих сортов наиболее благоприятными были полуденный и утренний фотопериоды. Для сорта проса Саратовское (табл. 3) при полуденном фотопериоде наиболее благоприятным оказался 8- и 10-часовой день; 12-часовой был уже слишком длинным; 6-часовой, — а в особенности 4-часовой, — тоже меньше способствовали развитию. Однако все эти варианты развивались быстрее, чем контрольные растения при естественном длинном дне. При утреннем фото-

Табл. 3. Развитие проса Саратовского при различной длине дня

Группа	Длина дня	от — до	Результаты микроморфо- логического анализа		Колошение	Количество дней со дня всходов до колошения	Ускорение в сравнении с контролем при длинном дне
			27/VI	30/VI			
Полуденный фотопериод	4	10—14	3 б	5 б	15/VII	48	3
	6	9—15	4	6	11/VII	44	7
	8	8—16	5 а	7	3/VII	36	15
	10	7—17	5 б	7	3/VII	36	15
	12	6—18	6	7	5/VII	38	13
Утренний фотопериод	4	6—10	—	4	15/VII	48	3
	6	6—12	—	5 б	12/VII	45	7
	8	6—14	—	6	6/VII	39	12
	10	6—16	—	7	4/VII	37	14
Вечерний фотопериод	4	14—18	—	—	погибло		
	6	12—18	—	—	27/VII	60	— 9
	8	10—18	—	5 а	12/VII	45	6
	10	8—18	—	7	6/VII	39	12
Kd (контроль— длинный день)			2 б	3 б	18/VII	51	

Табл. 4. Развитие проса Ганацкая Манна при различной длине дня

Группа	Длина дня	От — до	Колошение	Количество дней со дня всходов до колошения	Ускорение в сравнении с контролем при длинном дне
Полуденный фотопериод	4	10—14	19/VII	52	— 2
	6	9—15	6/VII	39	11
	8	8—16	3/VII	36	14
	10	7—17	3/VII	36	14
	12	6—18	3/VII	36	14
Утренний фотопериод	4	6—10	погибло		
	6	6—12	8/VII	41	9
	8	6—14	3/VII	36	14
	10	6—16	3/VII	36	14
Вечерний фотопериод	4	14—18	погибло		
	6	12—18	24/VII	57	— 7
	8	10—18	11/VII	44	6
	10	8—18	3/VII	36	14
Kd (контроль— длинный день)			17/VII	50	

Табл. 5. Развитие проса Ганацкая Манна при очень коротком дне

Длина дня	от — до	Результаты микро- морфологического анализа		Колошение	Количество дней со дня всходов до колошения	Ускорение в сравнении контролем при длин- ном дне
		21/VII	1/VIII			
2	7—9	1	погибло			
3	7—10	1	2 а	погибло		
4	7—11	2 а	5 б	19/VIII	49	— 3
8	7—15	3 б	7	4/VIII	34	12
Kd (контроль при длинном дне)		1	5 а	16/VIII	46	

периоде наиболее благоприятным был 10-часовой день, 8-часовой же уже меньше. Наименее благоприятен для развития вечерний фотопериод. Процесс развития точки роста отдельных вариантов Саратовского проса, по существу, отвечал порядку колошения этих вариантов (табл. 3).

У сорта Ганацкая Манна мы получили несколько иные результаты (табл. 4): этот чехословацкий сорт оказался менее приспособленным к короткому дню, чем просо Саратовское: при полуденном фотопериоде 12-часовой день оказался столь же пригодным для его развития, как 8- и 10-часовой. Меньше подходил 6-часовой, а при 4-часовом растения колосились даже позже, чем контрольные при длинном дне. При утреннем и вечернем фотопериоде 4-часовой вариант погиб в течение опыта, не колосясь.

Чтобы проверить, как протекает развитие при очень коротком фотопериоде, мы поставили с сортом Ганацкая Манна еще один опыт, включавший, кроме контроля при естественном дне, 2, 3, 4 и 8-часовый варианты. Как видно из табл. 5, контрольные растения колосились опять-таки раньше, чем 4-часовой вариант, однако предшествовавший этому микроморфологический анализ точек роста показал, что вначале развитие протекало при 4-часовом дне быстрее, чем при естественном длинном дне. 3-часовой вариант погиб в самом начале дифференциации. Погиб и 2-часовой вариант, точка роста которого осталась недифференцированной. Продолжительность освещения оказывала существенное влияние на рост растений, как видно из рис. 4—6 (табл. XVIII) и 12, 13: при очень коротком фотопериоде колосились растения всего полутора см в высоту. Рост при определенном фотопериоде зависел от того, на какое время дня приходился «день».

При своих опытах мы убедились, что просо Ганацкая Манна, при коротком периоде вегетации (Петр 1953), отличается сравнительно долгой световой стадией. Даже при 8-часовом дне, который ускоряет течение световой стадии в сравнении с естественным днем, этап фотопериодической чувствительности этого сорта тянется до 20-го дня со дня всходов. Исследователи, которые изучали другие сорта (Максимов 1928, Долгушин 1932, Разумов 1930 и Szalai 1949) установили, что этим сортам требуется не более 10 коротких дней.

В реакции проса Саратовского и Ганацкой Манны на различные фотопериоды можно отметить известную разницу: Саратовское несколько более коротко-дневно, чем Манна, которая на 12-часовой день реагировала еще как на короткий. Саратовское также лучше переносило очень короткий день. Ориентиро-

вочные опыты, с помощью которых мы хотели установить продолжительность фотопериодической чувствительности у обоих сортов, не выявили скольнибудь существенной разницы между ними. Таким образом, продолжительность этапа фотопериодической чувствительности и приспособленность к определенной

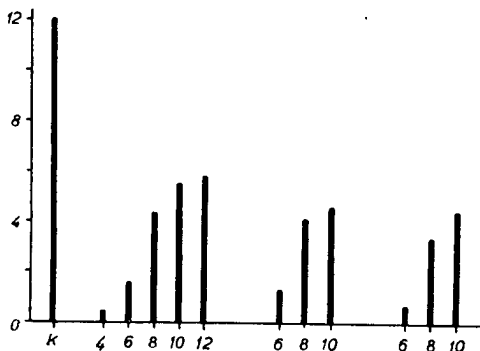


Рис. 12. Средняя высота растений проса Ганацкая Манна при различной продолжительности дня (после уборки). Слева направо: контроль при естественном дне, полуденный фотопериод, утренний фотопериод, вечерний фотопериод.

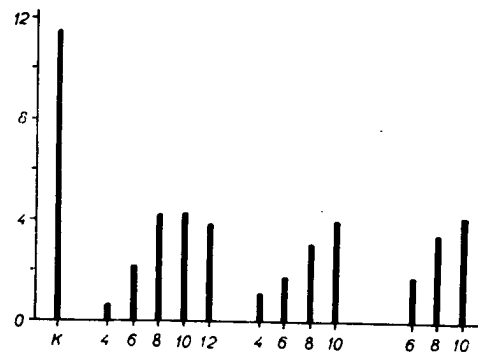


Рис. 13. Средняя высота растений проса Саратовского при различной продолжительности дня (после уборки). Слева направо: контроль при естественном длинном дне, полуденный фотопериод, утренний фотопериод, вечерний фотопериод.

длине дня — это два различных фактора. В литературе вопроса часто встречаются данные об относительной продолжительности фотопериодической чувствительности, полученные путем сравнения скорости развития разных сортов при коротком и при длинном дне (Разумов 1954, Самыгин 1946), однако они не отмечают разницы между длительностью фотопериодической реакции и приспособленностью к определенной длине дня.

Мы проследили развитие точки роста. Оказалось, что к концу этапа фотопериодической чувствительности точка роста бывает уже значительно дифференцирована, в особенности если развитие протекает при коротком дне. Об отношении между окончанием световой стадии и фазой развития точки роста существуют противоречивые мнения. Ими подробно занимается Федоров (1953, 1954), который доказывает на пшенице, что световая стадия заканчивается перед началом дифференциации точки роста, т. е. перед основанием колосовых бугорков. Мы при своих работах видели, что у проса фотопериодическая чувствительность прекращалась в фазе гораздо более значительного развития точки роста, в период основания тычинок (рис. 5б, табл. XVII). Эти разноречивые результаты показывают, что отношения между стадийным развитием и фазовым развитием точки роста не должны быть обязательно одинаковыми у всех растений и что они обусловлены и особенностями морфогенеза соцветия. Опыт с различной продолжительностью освещения показал, что развитие точки роста не должно совпадать с порядком колошения. Выяснилось, что напр., 4-часовой день ускоряет развитие проса Ганацкая Манна в тех фазах, когда — по данным наших предшествовавших опытов — протекает световая стадия, и что только в более поздних фазах при этом сильно сокращенном дне происходит задержка развития. На основании этого можно было бы заключить что по окончании периода, когда просо требует короткого дня, оно нуждается скорее в длинном дне. О подобных изменениях в требованиях по отношению к длине дня у чумизы пишет Трусаков (1955).

### Резюме

1. В настоящей работе мы исследовали вопрос прекращения фотопериодической чувствительности, а тем самым и окончания световой стадии у проса в связи с развитием точки роста.

2. Мы исследовали процесс развития двух сортов проса при различной продолжительности дня.

3. Подтвердилось, что при 8-часовом дне фотопериодическая чувствительность у проса Ганацкая Манна в благоприятных условиях сохраняется вплоть до 20-го дня со дня всходов.

4. Просо Ганацкая Манна приспособлено к несколько более долгому дню, чем Саратовское, что было особенно наглядно при 12- и 4-часовом дне.

5. Процесс дифференциации точки роста не должен обязательно совпадать с порядком колошения: у проса Ганацкая Манна 4-часовой день оказался более благоприятным для дифференциации точки роста, чем естественный (длинный) день, однако для дальнейшего развития метелки он был уже менее благоприятен, так что растения колосились позднее.

6. К концу этапа фотопериодической чувствительности точка роста бывает уже значительно дифференцирована: еще до прекращения фотопериодической чувствительности закладываются веточки и цветки будущей метелки, а в верхних цветках начинают уже закладываться тычинки.

### Л и т е р а т у р а

- Горжавка, Ф., Мартиновская, А., Стейскал, Б.: Фотопериодические опыты с просом. *Folia biol. (Praha)* 2 : 88, 1956.
- Долгушин, Д. А.: О комплексе факторов, обуславливающих плодоношение проса. *Бюлл. яровиз.* 1, 1932 (цит. по Самыгину).
- Куперман, Ф. М.: О развитии метелки овса. *ДАН СССР* 72 : 165, 1950.
- Куперман, Ф. М., Дворянкин, Е. А., Ржанова, Е. И., Ростовцева, З. П.: Этапы формирования органов плодоношения у злаков. МГУ 1955.
- Куперман, Ф. М., Ростовцева, З. П.: О формировании метелки у проса. *Доклады ВАСХНИЛ* 16 : 16, 1951.
- Максимов, Н. А., Разумов, В. И., Бородина, И. Н.: К физиологии фотопериодизма. *Дневник Всесоюз. съезда ботан.* 1928. (Цит. по *Biological Abstracts* 5 (26949), 1931.
- Ростовцева, З. П.: К вопросу о строении колоска у проса. *Агробиология* 15 : 155, 1950.
- Ростовцева, З. П.: Возникновение многоплодия у однолетних культурных злаков. *Селекция и семеноводство* 18 : 12, 1951.
- Разумов, В. И.: О фотопериодическом последствии в связи с влиянием на растения различных сроков посева. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции* 22 : 61, 1930. (Цит. по *Biological Abstracts* 7 (20681), 1933.
- Разумов, В. И.: Среда и особенности стадийного развития растений. Москва 1954.
- Самыгин, Г. А.: Фотопериодизм растений. *Труды инст. физиол. растений им. К. А. Тимирязева* 3 : 129, 1946.
- Трусаков, Ф. В.: Влияние длины дня на развитие чумизы. *Агробиология* 21 : 121, 1955.
- Федоров, А. К.: К вопросу о дифференциации конуса нарастания в связи со стадийным развитием растений. *Агробиология* 18 : 39, 1953.
- Федоров, А. К.: Об образовании генеративных органов в связи со стадийным развитием растений. *Труды Инст. генетики* 21 : 130, 1954.
- Petr, J.: Produktivita prosa po ozimých pčinách. *Diplom. práce agronom. fak. Vys. školy zeměd. Praha* 1953.
- Szalai, S.: Data of the Problem of Photoperiodism. *Acta biol. Hung.* 1 : 56, 1949.

## Die Entwicklung des Vegetationspunktes von Hirse und ihre Beziehung zur photoperiodischen Empfindlichkeit

F. SEIDLOVÁ und A. MARTINOVSKÁ

### *Zusammenfassung*

Bei der Sorte „Hanacká Mana“ wurde die Beziehung zwischen dem Ende der photoperiodischen Empfindlichkeit (Lichtstadium) am kurzen und am langen Tag und dem Grad der morphogenetischen Differenzierung des Vegetationspunktes untersucht. Zum Zeitpunkt der endenden photoperiodischen Empfindlichkeit am kurzen Tag (im Versuch am 20. Tag nach dem Auflaufen) war der embryonale Vegetationspunkt zu einer 3 mm langen Rispe differenziert, während sich in den oberen Blüten bereits die hügeligen Anlagen der Stamina ausbildeten. Am langen Tag (23 Tage nach dem Auflaufen) war die embryonale Rispe 0,5 mm lang und zeigte die Differenzierung der Äste zweiter Ordnung.

Bei den Sorten „Hanacká Mana“ und „Saratovské“ wurde auch die Geschwindigkeit ihrer Entwicklung in verschiedenen Photoperioden (4, 6, 8, 10 und 12 Stunden) bei Applikation zu verschiedenen Tageszeiten (morgens, mittags und abends) beobachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass bei der Hirse „Saratovské“ vom Standpunkt einer schnellen Entwicklung am günstigsten die acht- und zehnstündige Applikation am Morgen und am Mittag war. Auch bei der vierstündigen Photoperiode entwickelte sich die geprüfte Variante rascher als am langen Tag. Bei der Sorte „Hanacká Mana“ bewährte sich am besten die acht-, zehn- und zwölfstündige Photoperiode. Bei vierstündiger Photoperiode erfolgte das Schossen der untersuchten Variante später als bei der Kontrolle am langen Tag.

Beide geprüften Sorten wurden auch hinsichtlich des Grades und der Länge der photoperiodischen Empfindlichkeit untersucht, wobei festzustellen war, dass für die Hirse „Saratovské“ der kurze Tag günstiger ist als für die Sorte „Hanacká Mana“. Andererseits war kein wesentlicher Unterschied in der Länge der photoperiodischen Empfindlichkeit zu bemerken. Aus den Versuchsergebnissen wird geschlossen, dass die Dauer der photoperiodischen Empfindlichkeit und die Anpassung an eine bestimmte Länge des Tages zwei unterschiedliche Faktoren sind, die nicht miteinander verwechselt werden dürfen.

О. Печас: Гигантские клетки дрожжей.

Табл. XIII.

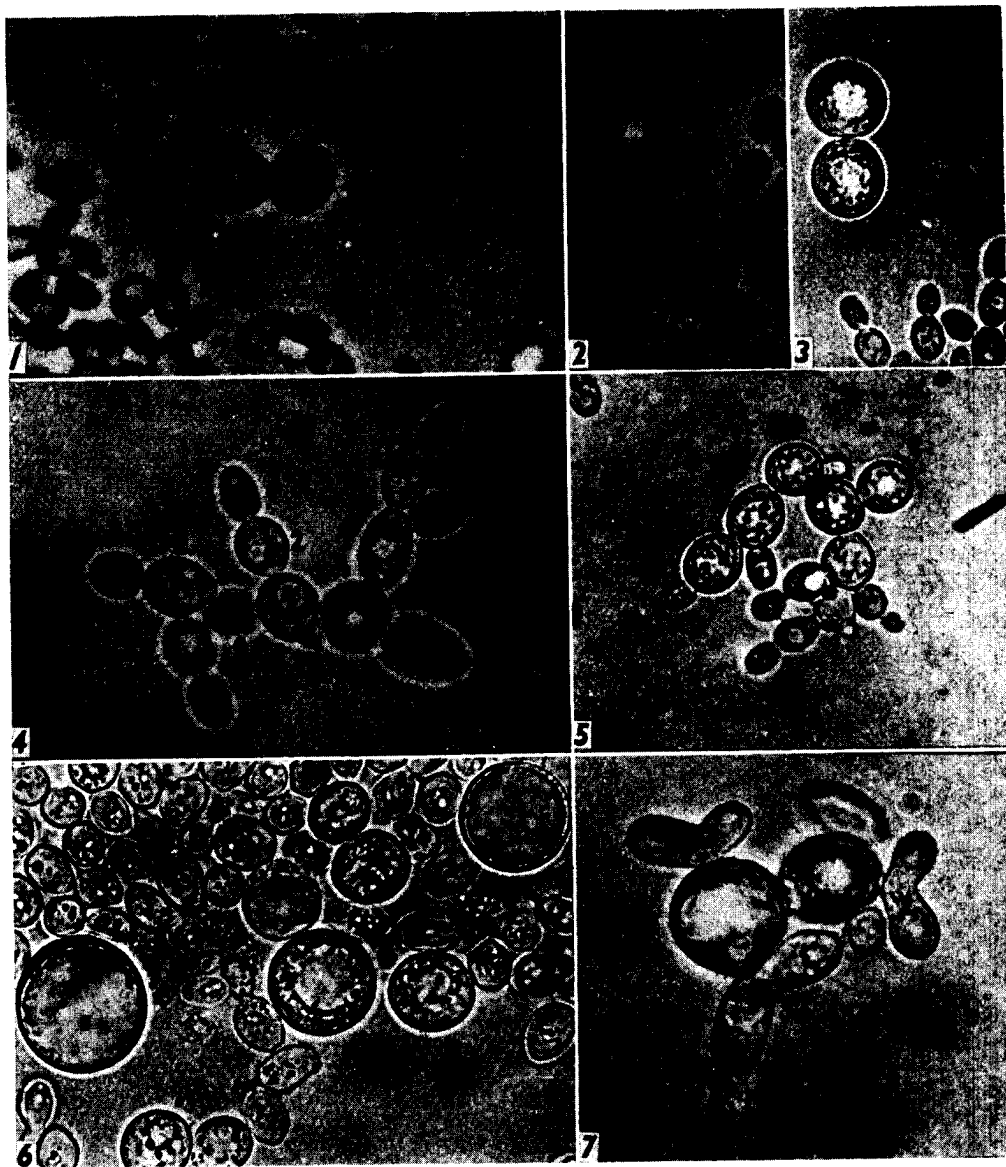


Рис. 1. Характерные двойные гигантские клетки. Вокруг нормальные клетки дрожжей. Увеличение  $600\times$ .

Рис. 2. Вторая из пары гигантских клеток дрожжей. Заметен большой индекс преломления. Увеличение  $600\times$ .

Рис. 3. Гигантские клетки круглой формы. Просветление в центре — не вакуоли, а оптический эффект, вызываемый высоким индексом преломления у клеток. Увеличение  $600\times$ .

Рис. 4. Путем почкования гигантские клетки через несколько поколений превращаются в нормальные дрожжи. М — материнская гигантская клетка. Цифры обозначают поколения дочерних клеток. Увеличение  $700\times$ .

Рис. 5. Почкование гигантских клеток. Характер гигантских клеток сохраняется в течение нескольких поколений. Увеличение  $600\times$ .

Рис. 6. Гигантские клетки из подвергающейся автолизу культуры дрожжей. Круглые клетки с гигантскими вакуолями. Увеличение  $1000\times$ .

Рис. 7. Атипичное почкование гигантских клеток с биполярными почками. Увеличение  $900\times$ .

О. Печас: Гигантские клетки дрожжей.

Табл. XIV.

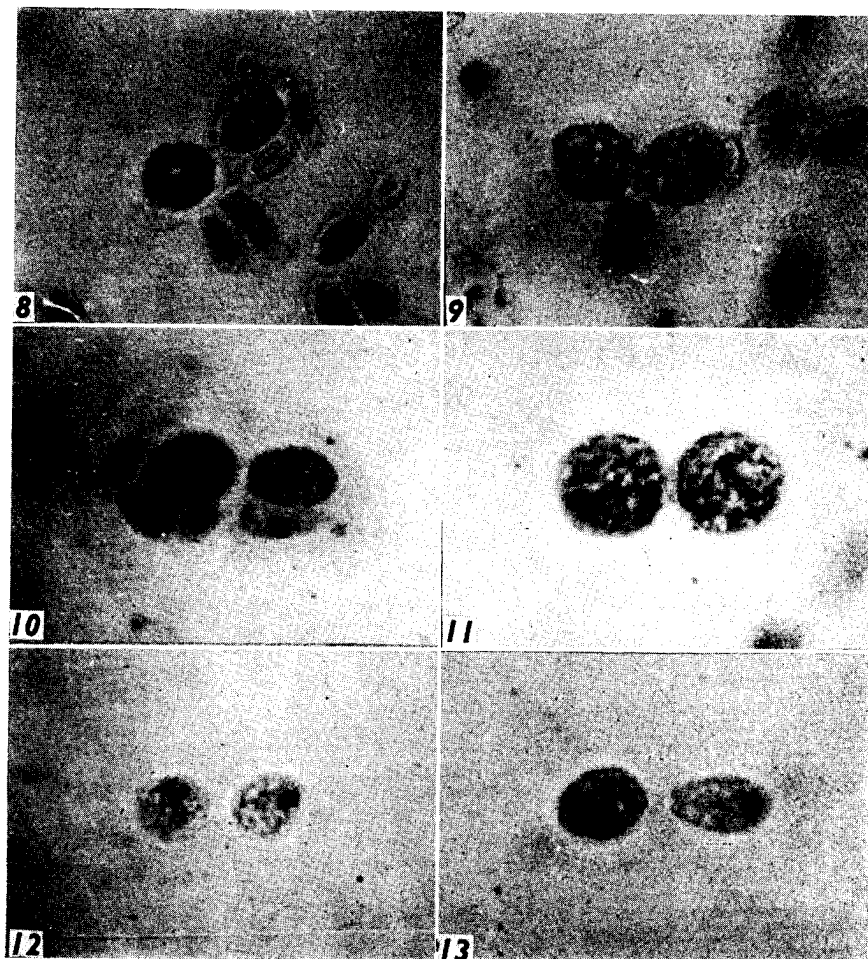
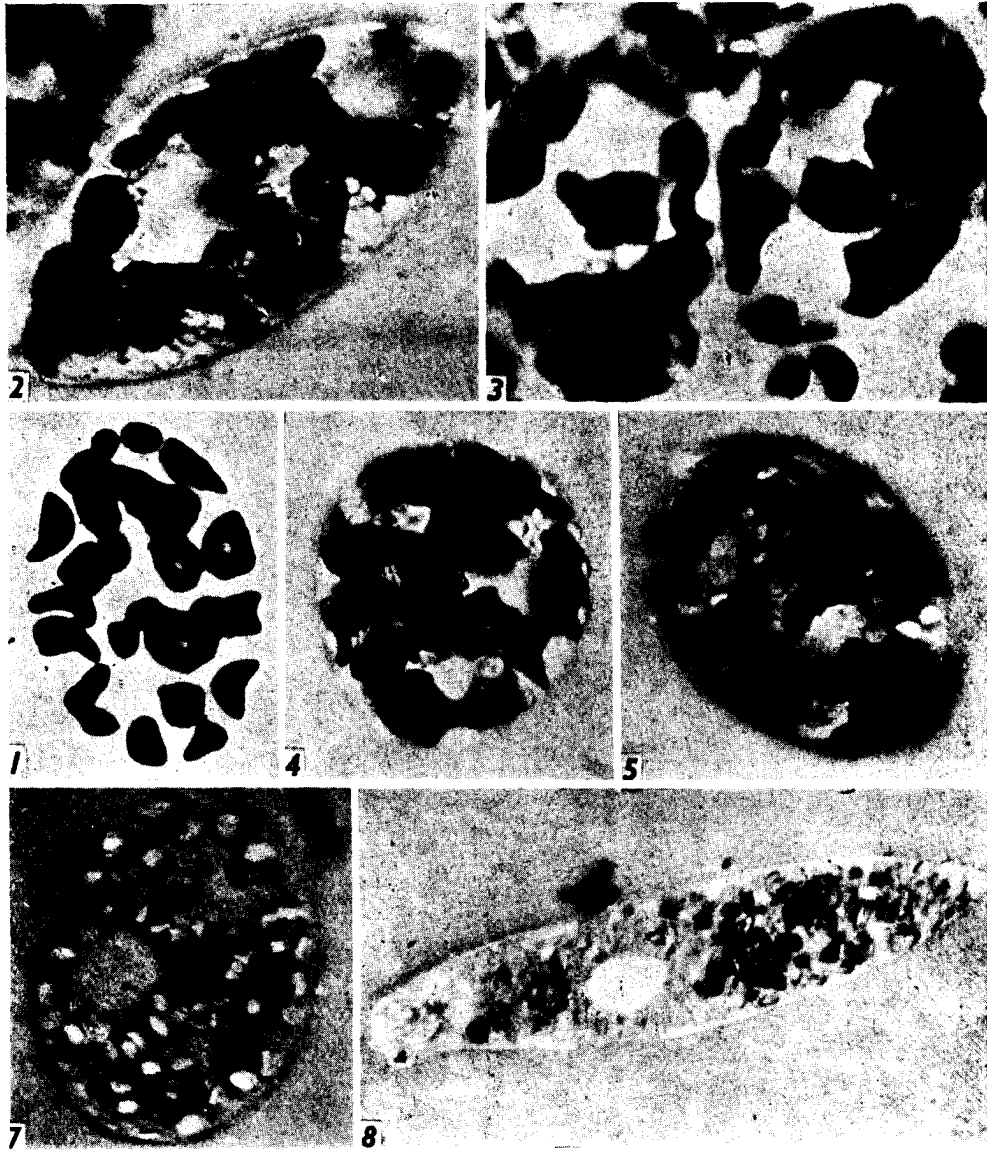


Рис. 8—10. Двойные гигантские клетки. Окраска по Фельгену. Только одна из клеток содержит ядро. Вокруг — ядра нормальных клеток, таких же размеров, как показывает сравнение. 11 после фиксации заметна зернистость структуры гигантских клеток. Увеличение 1500 $\times$ .  
Рис. 11. Особо крупная двойная гигантская клетка с одним ядром. Увеличение 1500 $\times$ .  
Рис. 12 и 13. Начинается почкование обеих гигантских клеток пары. В каждой из них уже находится ядро. Небольшие почки на снимках видны недостаточно отчетливо. Увеличение 1500 $\times$ .

J. Vávra: The Action of Streptomycin on Chloroplasts of the Flagellate  
*Euglena gracilis* Klebs.

Plate XV.



Figs. 1, 2, 3, 4 show cycle of chromatophores in normal green culture of *E. gracilis* Klebs (Mainx strain).  
 Fig. 1. *E. gracilis* from culture in stationary phase. Clearly visible oval or slightly lobular chloroplasts lying upturned against the periplast. Light centres in chloroplasts contain pyrenoid.  
 Fig. 2. Same *Euglenae* as in fig. 1, after 48 hours in fresh culture medium. Chloroplasts have lost their light centres and are more lobular. Division clearly discernible.  
 Fig. 3. Same *Euglenae* as in figs. 1 and 2, after 96 hours in fresh culture medium. Greater lobularity of plastids discernible, absence of light centres with pyrenoids. Some chloroplasts still in process of division. This state is maintained in the culture as long as growth continues.  
 Fig. 4. As soon as cultures reached stationary phase, light centres again apparent in chromatophores and culture approaches same appearance as in fig. 1.  
 Fig. 5. *E. gracilis*, Mainx strain, in light, 48 hours after transfer to fresh culture medium with 500 units streptomycin/ml. Chloroplasts slightly smaller, some clearly in process of division.  
 Figs. 7, 8. Further progressive diminution in size of chloroplasts during growth in culture containing streptomycin.

J. Várro: The Action of Streptomycin on Chloroplasts of the Flagellate  
*Euglena gracilis* Klebs.

Plate XVI.

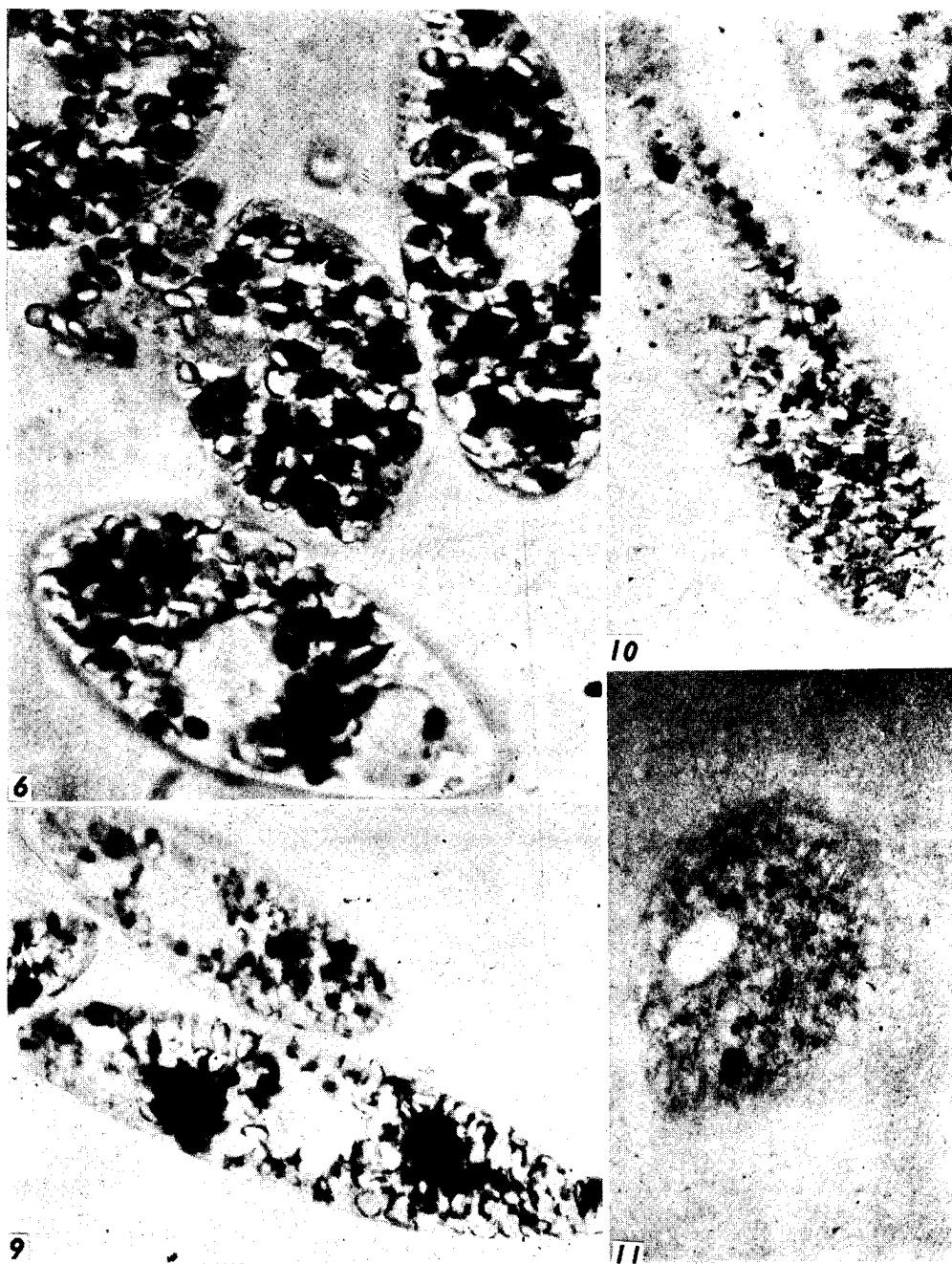


Fig. 6. Further progressive diminution in size of chloroplasts during growth in culture containing streptomycin.

Fig. 9. Plastids which have undergone degeneration and have accumulated in the area round the nucleus.  
Fig. 10. Remnants of chloroplasts already very small.

Fig. 11. Last phase of loss of plastids. Only stigma and minute carotenoid granules preserved.  
Photographed in "blue light", in vivo, with a photographic attachment, imm. 100 $\times$ , ocular 10 $\times$ . The same magnification was used for all photographs.

Ф. Сайдлова и А. Мартиновская: Развитие точки роста проса в связи с его фотопериодической чувствительностью. Табл. XVII.

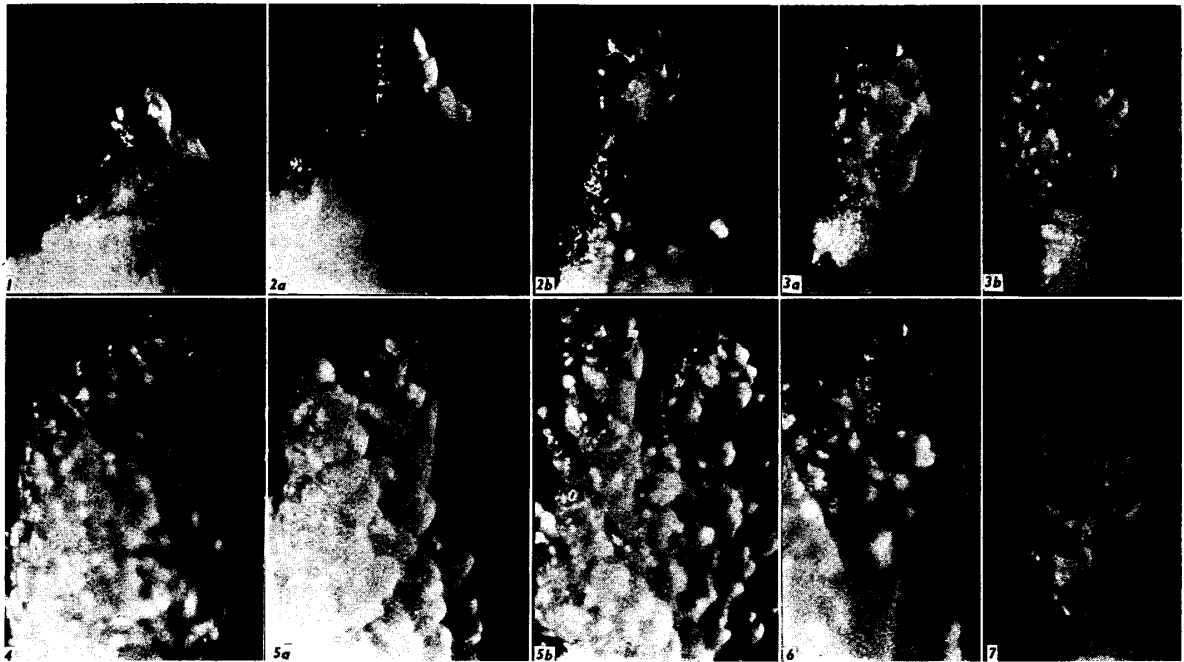


Рис. 1—7. Развитие точки роста у проса Ганацкая Манна. 1 — недифференцированная верхушка. 2а — начало дифференциации веточек второго порядка. 2б — закладывание веточек второго порядка. 3а — начало закладывания веточек третьего порядка. 3б — основания веточек третьего порядка. 4 — основания цветков. 5а — начало закладывания тычиночных бугорков. 5б — основания тычинок. 6 — разделение тычиночных бугорков на будущие пыльцевые мешки. 7 — формирование пестика. Номера рисунков отвечают морфологическим фазам точки роста, приведенным в тексте.

Ф. Сайдлова и А. Мартиновская: Развитие точки роста проса в связи с его фотопериодической чувствительностью Табл. XVIII.



Рис. 2. Точка роста проса Саратовского при естественном долгом дне. Фото 27/VI (возраст 46 дней).

Рис. 3. Точка роста проса Саратовского при 4-часовом дне (день с 10 до 14 часов). Фото 27/VI (возраст 46 дней).

Рис. 4—6. Внешний вид растений проса Саратовского при различной длине дня. Фото 19/VII 1955. 4 — полуденный фотопериод, 5 — утренний фотопериод, 6 — вечерний фотопериод. К — контроль при нормальном дне.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

INHALT

Sterzl, J.: The Transfer of Antibody Formation by Means of Polymorphonuclear Exudate (Штерцл, Я.: Перенесение образования антител клетками полиморфонуклеарного эксудата) . . . . .	65
Mitchison, N. A.: Adoptive Transfer of Antibody Production in Poultry by Spleen Tissue (Митчисон, Н. А.: Адоптивная передача образования антител при помощи ткани селезенки у кур) . . . . .	72
Grozdanovič, J.: Immunological Tolerance of Rats to Human Erythrocytes (Грозданович, Я.: Иммунологическое сближение крыс по отношению к эритроцитам человека) . . . . .	77
Rokos, J., Burger, M., Procházka, P.: The Influence of Chlortetracycline on the Activity of $\alpha$ -amylase of the Production Strain of <i>Actinomyces aureofaciens</i> (Рокос, И., Бургер, М., Прохазка, П.: Влияние хлортетрациклина на активность $\alpha$ -амилазы производственного штамма <i>Actinomyces aureofaciens</i> ) . . . . .	83
Beran, K., Burger, M., Zelenka, S.: New Findings in the Use of Fungous Amylolytic Preparations for the Saccharification of Potato Mash. Semi-pilot Plant Experiments with Fungous Preparations in the Production of Alcohol from Potatoes (Беран, К., Бургер, М., Зеленка, С.: Новые данные по вопросу применения грибковых амилолитических препаратов для осахаривания картофельных заторов) . . . . .	89
Нечас, О.: Гигантские клетки дрожжей (Nečas, O.: Giant Yeast Cells) . . . . .	101
Vávra, J.: The Action of Streptomycin on Chloroplasts of the Flagellate <i>Euglena gracilis</i> Klebs (Вавра, Ю.: Действие стрептомицина на хлоропласты жгутиковых <i>Euglena gracilis</i> Klebs) . . . . .	108
Прокопич, Я.: Влияние экологических факторов на специфичность паразитических червей у насекомоядных (Prokopič, J.: The Influence of Oecological Factors on the Specificity of Parasitic Worms of Insectivora) . . . . .	114
Сайдлова, Ф., Мартиновская, А.: Развитие точки роста проса в связи с его фотопериодической чувствительностью (Seidlová, F., Martinovská, A.: Die Entwicklung des Vegetationspunktes von Hirse und ihre Beziehung zur photoperiodischen Empfindlichkeit) . . . . .	120